

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Технологія виробництва вітаміну В₂ на глюкозо-фруктозному сиропі. Дільниця підготовки поживного середовища»

Виконав (-ла):

студент (-ка) IV курсу, групи БТ-62

Гнатюк Маргарита Олегівна _____

Керівник:

Доцент, к.т.н.,

Поліщук Валентина Юріївна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу:

Старший викладач, к.т.н.,

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

Доцент, к.т.н.,

Козар Марина Юріївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному проєкті немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.

Студент (-ка) _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 6204. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	116	
3	A1	ДП 6204. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 6204. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6204. 03.000 ТК	Реактор з механічним перемішуючим пристроєм	1	

				ДП 6204 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Гнатюк М.О.			Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.	Поліщук В.Ю.				1	116
Консульт.	Фесенко С.В.				КПП ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Гнатюк Маргариті Олегівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва вітаміну В₂ на глюкозо-фруктозному сиропі. Дільниця підготовки поживного середовища», керівник проєкту Поліщук Валентина Юріївна, к.т.н, доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: штам суперпродуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* F-340; середовище культивування на основі глюкозо-фруктозного сиропу: ГФС-10, дріжджовий екстракт, пептон, К₂НРО₄; реактор з механічним перемішуючим пристроєм для приготування поживного середовища; параметри культивування: t = 28-30°C, аерація 1,5-2 м³/м³·хв, перемішування, τ = 120-125 год; спосіб сушіння продукту – вакуум висушування; кінцевий продукт – порошок рибофлавіну у флаконах для харчової промисловості.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва вітаміну В₂; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції реактору з механічним перемішуючим пристроєм, здійснити технологічний, конструктивний, тепловий та матеріальний розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду реактора з механічним перемішуючим пристроєм – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	01.03.20-14.03.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	15.03.20-31.03.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	01.04.20-14.04.20	
4.	Технологічна частина	14.04.20-22.04.20	
5.	Складання апаратурної схеми	23.04.20-27.04.20	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	28.04.20-15.05.20	
7.	Оформлення пояснювальної записки	15.05.20-05.06.20	

Студент

Маргарита ГНАТЮК

Керівник

Валентина ПОЛІЩУК

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва вітаміну В₂ на
глюкозо-фруктозному сиропі. Дільниця підготовки
поживного середовища»**

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект: 116 с., 17 рис., 5 табл., 80 посилань.

Робота присвячена розробці технології виробництва харчового вітаміну В₂ на глюкозо-фруктозному сиропі. Особлива увага приділена ділянці підготовки поживного середовища.

Запропоновано в якості продуценту рибофлавіну використовувати штам суперпродуценту *Eremothecium ashbyi* F-340, отриманий шляхом здійснення підтримуючої селекції з наступним відбором колоній, які мають інтенсивне яскраво-жовте забарвлення та інтенсивно забарвлюють поживне середовище. Також у разі зниження продуцентом рівня біосинтетичної здатності запропоновано застосовувати ультрафіолете опромінення міцелію гриба, що підвищує синтез рибофлавіну на 70–80 %.

Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *Eremothecium ashbyi* F-340 обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі глюкозо-фруктозного сиропу, наведені оптимальні джерела фосфору та нітрогену. Складено матеріальний баланс виробництва харчового вітаміну В₂.

Запропоновано конструкцію реактора-змішувача об'ємом 1 м³, що забезпечує умови приготування необхідного поживного середовища. Розраховано конструктивні розміри апарату і підібрані матеріали для його виготовлення. В роботі обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схема виробництва.

ВІТАМІНИ, МІКРОБНИЙ СИНТЕЗ, РИБОФЛАВІН, *EREMOTHECIUM ASHBYI*, ХАРЧОВА ПРОМИСЛОВІСТЬ, ВІТАМІН В₂, Е 101

					ДП 6204. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Гнатюк М.О.				Д	5	116
Консульт.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Поліщук В.Ю.						
Затвер.								

ABSTRACT

The graduation project: 116 pages, 15 figures, 5 tables, 80 references.

The project is devoted to the development of technology for the production of food vitamin B₂ on glucose-fructose syrup. Particular attention is paid to the area of nutrient preparation.

As a producer of riboflavin, it is proposed to use a superproducer strain of *Eremothecium ashbyii* F-340, obtained by carrying out maintenance selection, followed by selection of colonies that have an intense bright yellow color and intensely color the nutrient medium. Also, in case the level of biosynthetic ability of the producer was reduced, it is proposed to use ultraviolet radiation of the mycelium of the fungus, which increases the synthesis of riboflavin by 70-80%.

Taking into account the physiological and biochemical features of the producer *Eremothecium ashbyi* F-340, the composition of the nutrient medium for industrial biosynthesis based on glucose-fructose syrup was selected, the optimal sources of phosphorus and nitrogen are given. The material balance of production of food vitamin B₂ is made.

The design of a reactor-mixer with a volume of 1 m³ is proposed, which provides the conditions for preparation of the required nutrient medium. The constructive sizes of the device and the chosen materials for its manufacturing are calculated. The technological and hardware scheme of production are substantiated and presented in the work.

VITAMINS, MICROBIAL SYNTHESIS, RIBOFLAVIN,
EREMOTHECIUM ASHBYI, FOOD INDUSTRY, VITAMIN B₂, E 101

					ДП 6204. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ABSTRACT	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Гнатюк М.О.				Д	6	116
Консульт.								
Керівник		Поліщук В.Ю.				КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ АГЕНТІВ.....	12
1.1 Основні промислові продуценти.....	12
1.2 Систематичне положення.....	14
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки.....	15
1.4 Культуральні ознаки.....	16
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки.....	17
1.6 Поширення в природі.....	19
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	20
2.1 Характеристика кінцевого продукту.....	20
2.2 Схема хімічних перетворень.....	22
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	26
2.4. Методи очистки цільового продукту.....	30
2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	31
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ....	33
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту	33
3.1.1 Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи.....	34
3.1.2 Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.....	42
3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту	43
3.2.1 Використання штучного добору для отримання промислових продуцентів.....	45
3.2.2 Використання індукованого мутагенезу.....	46

					ДП 6204. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Гнатюк М.О.				Д	7	116
Консульт.								
Керівник		Поліщук В.Ю.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

3.2.3 Використання метаболічної інженерії.....	49
3.2.4. Використання методів генної та клітинної інженерії.....	49
3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	51
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	53
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	53
4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовується у виробництві.....	54
4.3 Опис технологічного процесу.....	57
4.4 Матеріальний баланс.....	71
4.5 Контроль виробництва.....	73
4.6 Технологічна схема виробництва.....	77
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	78
5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	78
5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	89
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання.....	103
5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	104
ВИСНОВКИ.....	107
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	108

ВСТУП

Вітаміни – це низькомолекулярні органічні сполуки біорегулятори, необхідні в невеликих кількостях для нормальної життєдіяльності людини.

Вітаміни надходять в організм з їжею або у формі лікарських препаратів при певних патологічних процесах. З жиро- і водорозчинних вітамінів відомі біотехнологічні процеси виробництва вітамінів B₂, B₁₂, D₂, C (стадія біотрансформації D-сорбіту в L-сорбозу), β-каротину [1].

Біологічна роль вітамінів визначається їх каталітичною, некоферментною і антимуtagenною дією. Багато вітамінів (практично всі вітаміни групи B) входять до складу коферментів різних ферментів, наприклад, вітамін B₂ - до складу коферментів ФАД, ФМН, вітамін B₅ - до складу НАД і НАДФ, вітамін B₃ - до складу КоА і т. д. Некоферментні функції вітамінів полягають в їх участі в регуляції синтезу нуклеїнових кислот, білків, в формуванні структури клітинних мембран. Важливе значення має антимуtagenна дія вітамінів C, E (α-токоферолу) і β-каротину (провітаміну A). Ці вітаміни можуть нівелювати як спонтанні мутації, так і мутації, індуковані іонізуючим випромінюванням і канцерогенами.

Зокрема, одним з найважливіших вітамінів для нормального функціонування організму людини є рибофлавін (вітамін B₂). Людський і тваринний організми не здатні до синтезу даного вітаміну, проте в них наявні ферменти рибофлавін-кіназа та ФАД-синтаза, що дозволяють самостійно перетворювати отриманий з їжею рибофлавін в його коферментні похідні [2, 3]. Крім того, нестача рибофлавіну призводить до великої кількості небажаних наслідків та хвороб, серед яких запальні процеси слизової оболонки язика (глосит), губ, катаракта (помутніння кришталика), анемія та багато інших [4, 5]. Також варто зазначити, що найважливішими перевагами

					ДП 6204. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП		
Розробив	Гнатюк М.О.						
Консульт.							
Керівник	Поліщук В.Ю.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	9	116
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

мікробіологічного синтезу над хімічним є використання дешевої сировини, часто у вигляді промислових відходів, можливість синтезу складних органічних сполук в одну стадію в м'яких умовах (низька температура, невисокий тиск). Продукти, отримані методами хімічного виробництва, являють собою суміші і вимагають ретельної очистки для отримання високоочищеного вітаміну, це збільшує час, необхідний для отримання бажаної кількості вітаміну. Зокрема, продуцент рибофлавіну здатен рости на простих поживних середовищах, напівпродуктах, відходах харчової промисловості, а біомаса є цінним джерелом кормового білку, що робить виробництво безвідходним.

За проведеним аналізом наукової літератури було встановлено, що активно проводиться вдосконалення поживного середовища для культивування продуценту рибофлавіну. В даному проекті, за результатами попередніх досліджень в цьому напрямку, запропоновано оптимізувати поживне середовище шляхом додавання фосфатів у вигляді K_2HPO_4 у визначених концентраціях, що є новизною дипломного проєкту. Також до новизни роботи варто віднести розробку технології отримання харчового вітаміну B_2 шляхом мікробного синтезу, адже подібного виробництва в Україні не існує.

Розробка біотехнології рибофлавіну є важливою складовою наукових досліджень для досягнення здорового способу життя населення, що підтверджує актуальність даного проєкту в умовах сьогодення.

Тому метою дипломного проєкту була розробка ефективної та економічної технології виробництва вітаміну B_2 , призначеного для використання в харчовій промисловості.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні задачі:

- аналіз продуцентів рибофлавіну, що застосовуються в промисловості, вибір продуценту для мікробного синтезу рибофлавіну, встановлення його морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних ознак, аналіз способів створення високопродуктивних промислових продуцентів;

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

- встановлення характеристик кінцевого продукту та вибір методів виділення та очистки цільового продукту, обґрунтування оптимальної технології виробництва;
- вибір оптимального поживного середовища для культивування продуценту рибофлавіну;
- розробка технологічної та апаратурної схем отримання харчового рибофлавіну;
- обґрунтування вибору реактора для ділянки приготування поживного середовища.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
						11
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ АГЕНТІВ

1.1 Основні промислові продуценти

Здатністю до синтезу вітаміну В₂ володіє чимала кількість вищих рослин та мікроорганізмів, серед них бактерії, гриби та дріжджі. Проте у тварин ця здатність відсутня, тому вони потребують надходження даного вітаміну з їжею.

Загалом мікроорганізми-продуценти В₂ можна віднести до 3-х груп:

- 1) слабкі (*Clostridium acetobutylicum*);
- 2) помірні (дріжджі *Pichia guilliermondii*, *Candida flareri*);
- 3) сильні суперпродуценти (*Eremotecium ashbyii*, *Ashbya gossypii*)

[1].

Порівнюючи суперпродуценти, що найчастіше використовуються промисловості, можна зазначити, що суттєвих відмінностей між ними по морфологічним особливостям немає. Це підтверджує запропоновану Kurtzman'ом таксономічну класифікацію, засновану на результатах дивергенції послідовностей рРНК і рибосомальної ДНК, що дозволяє віднести їх до одного роду сімейства *Eremotheciaceae*. Загальними спільними ознаками є: можливість наявності здатних до брунькування, мультилатеральних на тонкій основі клітин кулястої, яйцеподібної, еліпсоїдальної або циліндричної форми; утворення конідій і присутності псевдогіфи; наявності асків з веретеноподібними або голчастими аскоспорами, часто вигнутими і септованими [2, 3].

Варто зазначити, що макроморфологічними особливостями *Eremothecium ashbyi* є формування більших (в 1,5-2 рази) в порівнянні з *A. gossypii* матових колоній на твердих поживних середовищах, які стають

					ДП 6204. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Гнатюк М.О.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ АГЕНТІВ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	12	116
Керівник		Поліщук В.Ю.						
Затвер.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

глянцевими при культивуванні понад 3 доби [2]. Також відмінною морфологічною особливістю *E. ashbyi* є формування помітно вигнутих, серповидних аскоспор, в той час як аскоспори *A. gossypii* є голковидними, довжиною більше 20 мкм [4].

Недоліком *E. ashbyi* є його нестабільність при зберіганні, а недоліком *A. gossypii* – тривалий процес культивування та складні й дорогі середовища [1].

Важливою перевагою суперпродуцентів *Eremotecium ashbyi* та *Ashbya gossypii* над помірними продуцентами, наприклад дріжджами *Pichia guilliermondii*, є відсутність впливу іонів заліза на біосинтез рибофлавіну при їх використанні в промисловості. В той же час дріжджі *Pichia guilliermondii* є дуже чутливими до іонів заліза, через це середовища культивування необхідно ретельно очищувати від іонів Fe, що ускладнює процес культивування [1]. *P. guilliermondii*, будучи гетероталічним видом, існує як у гаплоїдних, так і в диплоїдних станах і може утворювати спори. *P. guilliermondii* - типовий представник аеробних дріжджів і не можуть рости в суворо анаеробних умовах. Клітини *P. guilliermondii* неоднорідні, переважно видовжені за формою (приблизно 2×10 мк), іноді утворюють псевдоміцелій [5].

Clostridium acetobutylicum є слабкими продуцентами рибофлавіну. Вегетативні клітини бактерій рухливі, великі паличкоподібні, розташовані поодинокі, попарно або короткими ланцюжками, в залежності від стадії розвитку культури. Забарвлення по Граму позитивне. Утворюють ендоспори. Тип утворення спор бацилярний, спори овальні, діаметр 2-2,5 мкм. Через 48 годин росту в анаеробних умовах утворює круглі гладкі з рівними краями колонії розміром від 1 до 2-2,2 мм. Структура колоній однорідна, колір - від світло-сірого до білого, непрозорі, поверхня гладка, блискуча [6].

Порівняльна характеристика мікроорганізмів-продуцентів рибофлавіну наведена в таблиці 1.1.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

Таблиця 1.1 Порівняльна характеристика основних промислових продуцентів [4]

Продуцент	Максимальна концентрація рибофлавіну, г/дм ³	Тривалість культивування, діб
<i>Bacillus subtilis</i>	16	2
	11,7	3
	13,4	2
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	15,3	3
<i>Debaryomyces hansenii</i> (<i>Candida famata</i>)	10,0	6
	1,3	5
<i>Meyerozyma (Pichia, Candida) guilliermondii</i>	0,2	3
	8 мг/г АСБ	
<i>Eremothecium ashbyi</i>	3,1	4
	3,3	7
	4,5	7
	1,1	7
<i>Eremothecium gossypii</i>	2,5	4
	8,7	6
	6,4	7
	0,228	

1.2 Систематичне положення

В даній роботі для біосинтезу рибофлавіну використовується суперпродуцент *Eremothecium ashbyi*, що відноситься до *Fungi*, *Ascomycota*, *Saccharomycotina*, *Saccharomycetes*, *Saccharomycetidae*, *Saccharomycetales*, *Eremotheciaceae* згідно Dictionary of the Fungi 2008 [7]

У відповідності з сучасною класифікацією рід *Eremothecium* включає в себе 5 видів і займає наступне таксономічне положення [8, 9, 10]:

Царство: *Fungi*

Відділ: *Ascomycota*

Клас: *Saccharomycetes* G. Winter (1880)

Порядок: *Saccharomycetales* Kudryavtsev (1960)

Родина: *Eremotheciaceae* Kurtzman (1995)

Рід: *Eremothecium* Borzi (1888)

Види:

E. cymbalariae Borzi (1888);

E. ashbyi (syn. *Crebrothecium ashbyi*) Guillerm. (1935);

E. coryli (syn. *Nematospora coryli*, *Nematospora nagpuri*) (Peglion) Kurtzman (1995);

E. gossypii (syn. *Ashbya gossypii*, *Nematospora gossypii*, *Spermophthora gossypii*) (S.F. Ashby & W. Nowell) Kurtzman (1995);

E. sinecaudum (syn. *Holleya sinecauda*, *Nematospora sinecauda*) (Holley) Kurtzman (1995).

Результати, отримані Kurtzman'ом при аналізі рибосомальної ДНК видів родів *Ashbya*, *Eremothecium*, *Holleya*, *Nematospora*, що тісно пов'язані між собою і відносяться до підкласу геміаскоміцетів, є основою для даної класифікації. Той факт, що відмінність у нуклеотидній послідовності виявилась незначною, дозволив об'єднати їх в один рід *Eremothecium* нової родини *Eremotheciaceae* [7].

1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

E.ashbyi відноситься до аскоміцетів, що не утворюють плодові тіла. Має дихотомічно розгалужений міцелій яскраво-жовтого кольору, що складається з багатоядерних клітин, які з віком жовтіють. В процесі онтогенезу мікроміцету міцелій вакуолізується і потовщується. Рибофлавін через велику кількість може накопичуватись у вакуолях у вигляді кристалів, що і зумовлює колір міцелію [12].

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

Окрім включень рибофлавіну, всередині міцелію *E. ashbyi* в ліпідних краплях і ліпосомах знаходиться ефірна олія. Тому при фарбуванні Суданом III вони набувають жовтого кольору [13].

Спорогенез починається при старінні культури, не раніше стаціонарної фази: аски з аскоспорами формуються інтеркалярно (вставочно по ходу гіфи), а клітини, що здатні до брунькування (конідії) – термінально або латерально на гіфах міцелію [14]. Діаметр гіф варіює в межах 2,5-16,5 мкм. Конідії веретеноподібні. Спорангії розташовані ланцюжках, але іноді і одиночні (65-90x14-20 мкм), в них вільно знаходяться аскоспори (4-32 аскоспор [13]), які вивільнюються і проростають після розриву оболонки аска внаслідок старіння [11]. Спори булавоподібно-голчаті, прямі або часто винуті, прості, частина спори звужується до кінця і позбавлена гранул. Розміри аскоспори складають: довжина - 20,2-26,7 мкм, діаметр - 2,5-2,8 мкм [4, 11, 12, 13].

1.4 Культуральні ознаки

E. ashbyi Guilliermond 1935 на агаризованому середовищі, що містить 4% солодового та 0,5% дріжджового екстрактів, при температурі 20–22°C утворює бліді, плоскі, матові (потім глянцеві) колонії (d=5 мм), які з часом набувають яскраво-жовтого кольору, що зумовлений виділенням рибофлавіну. Колонії легко знімаються з агару. На сусло-агарі через 3 доби росту при 28°C округлі колонії досягають діаметру 8-12 мм [14]. Колонії сухі, форма колоній округла, з чітким дольчатим краєм, гладкі, пізніше на поверхні утворюються радіальні борозди [11, 15]. На м'ясо-пептоновому, поживному агарі і агарі Сабуро пігментація менш виражена в порівнянні з глюкозо-фруктозним агаром, сусло-агаром і середовищем Чапека [14]. На рідких середовищах *E. ashbyi* росте у вигляді ниткоподібних структур у товщі поживного середовища, при цьому культуральна рідина залишається прозорою та забарвлюється у жовтий колір, інтенсивність якого залежить від

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

кількості синтезованого вітаміну В₂. При УФ-світлі спостерігається виражена жовто-зелена флюорисценція, що свідчить про накопичення рибофлавіну [4].

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

E. ashbyi росте в діапазоні температур 20-35 °С, оптимальна область – 26-28 °С (при 37 °С ріст припиняється). Область рН для росту 3,2-7,5, оптимум рН 5,5-6,5. По відношенню до кисню є аеробом в умовах поверхневого і глибинного культивування [14]. Використання (утилізація) джерел вуглецю і азоту, вивчені в основному на модифікаціях середовища Чапека [16], полягають в наступному: *E.ashbyi* в якості джерела вуглецю використовує глюкозу, фруктозу, рафінозу, сахарозу, гліцерин, ацетат і цитрат, не засвоює крохмаль, целюлозу, етанол, інозит, коагулює молоко, слабо розріджує желатин. Крім того, синтезує ефірне масло, до складу якого входить гераніол (65,5-80,9%), цитронелол (6,0-11,4%), нерол (1,8-3,4%), β-фенілетанол (9, 1-20,1%) [15].

За допомогою додавання ненасичених жирних кислот можна стимулювати біосинтез рибофлавіну. В той же час, додавання насичених жирних кислот уповільнює його утворення. Розвиток *E. ashbyi* можна стимулювати шляхом додаванням біотину, тіаміну, інозиту. Так як піримідинові та пуринові основи – попередники утворення рибофлавіну, то їх також можна використовувати для його більш інтенсивного біосинтезу. Відомо, що ксантин вважається найкращим стимулятором [1, 17].

E. ashbyi поряд із синтезом рибофлавіну здійснює підвищений синтез ФАД. Збільшити накопичення ФАД можна за рахунок внесення мальтози після 48 год культивування *E. ashbyi* на середовищі з глюкозою [1].

Як поживне середовище для культивування можна використовувати:

- 1-3% меляси, гідрола або глюкози, 3-8% кукурудзяного екстракту або дріжджового автолізу, додаючи N, P₂O₅, K, Mg, Zn.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

- масло, соєве борошно, кукурудзяний екстракт, крейду та буряковий або яблучний порошок.

- глюкоза (5г/л), соняшникова олія(15г/л), рН 6,5-7,0.

- 5% цукру-сирцю, 3% пептону, 1% пшеничних зародків, 0,3% м'ясного екстракту, 0,3% K_2HPO_4 та 0,25% NaCl . рН 6,0.

- 3% соєвого борошна, 8% меляси, 1% білково-вітамінного концентрату, 0,5% крейди, 0,1% NaCl [1].

Для забезпечення потреб *E. ashbyi* при культивуванні у середовище необхідно додавати С, N, P, K, Mg, Zn [4]. Варто зазначити, що форма включення фосфатів у поживне середовище для культивування *Eremothecium ashbyi* впливає в подальшому на вихід біомаси та вміст загальних флавінів. Так, додавання фосфатів у вигляді K_2HPO_4 призводить до отримання максимальних значень концентрації рибофлавіну в культуральній рідині. Однак додавання K_2HPO_4 , навпаки, призводить до зниження рівня накопичення біомаси [18].

Крім того, для біосинтезу рибофлавіну та накопичення біомаси культурою *E. ashbyi* необхідні різні джерела С. Моносахариди, такі як фруктоза і галактоза, та 6-ти атомний спирт сорбіт використовують для підвищення біосинтезу рибофлавіну. А більший вихід біомаси спостерігається при наявності в середовищі фруктози, сахарози та гліцерину.

Доведено, що найкращим джерелом нітрогену для *E. ashbyi* є дріжджовий екстракт. Кількість рибофлавіну при його використанні є на 54–60% більшою, ніж при додаванні до середовища культивування інших джерел N [4].

Сталість властивостей культури при пересіві та зберіганні культури є надзвичайно важливою для проведення досліджень та промисловості. За допомогою систематичного пересіву на тверді поживні середовища штам *E. ashbyi* можна зберігати в активному стані тривалий час. Відбирати для пересіву слід колонії, що є забарвленими в жовто-гарячий колір найбільш інтенсивно [4, 19].

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

Якщо культуру *E. ashbyi* передбачено зберігати в активному стані нетривалий час, доцільним вважається використання агаризованих ГПД та соєвому середовищах та на ГПД під шаром вазелінової олії при температурі зберігання 5°C. При тривалому зберіганні рекомендується використовувати агаризоване глюкозо-пептонно-дріжджове середовище за кімнатної температури. На рідкому ГПД міцелій здатний зберігати свою життєздатність протягом 7 місяців [4].

E. ashbyi здатен здійснювати як вегетативне розмноження, так і нестатеве.

За рахунок відділення, а пізніше розростання та дихотомічного розгалуження фрагментів міцелію здійснюється вегетативне розмноження. Нестатеве розмноження характеризується термінальним та латеральним формуванням на міцелії конідій, що мають видовжену форму [4, 11].

1.6 Поширення в природі

Eremothecium ashbyi є фітопатогеном, тобто відноситься до групи грибів, що є паразитами рослин, зокрема він паразитує на коробочках бавовнику і цитрусах [11, 20]. *E. ashbyi* інфікує рослини при проколі їх тканин комахами. Крім прогнозованих випадків, 2008 році було помічено інфікування даним видом сої [1, 11]. На цьому розширення зони ураження даним фітопатогеном разом з *E. coryli* не закінчилось і через рік вперше були інфіковані боби квасолі адзуки [21]. Виявлено, що переносниками гриба були клопи *Riptortus clavatus* та *Riptortus pedestris*, які стали гарним середовищем для зимування *E. ashbyi* [4].

Згідно з класифікацією мікроорганізмів, що є патогенними для людини [22], *E. ashbyi* не є патогеном по відношенню до людини.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика кінцевого продукту

Цільовий продукт є добавкою для харчової промисловості E101 – рибофлавін, що отримується мікробіологічним синтезом з гриба *Eremothecium ashbyi*. Використовується в якості барвника жовтого кольору та для збагачення продуктів харчування вітаміном B₂. Харчова добавка E101 вважається безпечною і навіть корисною при вживанні з їжею.

За класифікацією вітамінів рибофлавін відноситься до водорозчинних вітамінів групи B та є вітаміном B₂ (вітамін росту) [23, 24].

Назва вітаміну (рибофлавін) була запропонована Каррером і Купом за рахунок того, що у його склад входить рибоза, а він сам має жовте забарвлення (флавіновіт).

За своєю структурою вітамін B₂ являє собою метильоване похідне ізоаллоксазину, з'єднане зі спиртом рибітолом Гетероциклічна ізоаллоксазинова система, що лежить в основі будови рибофлавіну, має 3 конденсованих цикли: ароматичний, піразиновий та піримідиновий. До азоту піримідинового кільця приєднаний спирт рибіт [4]. Саме ізоаллоксазинове кільце в окисленій формі надає вітаміну жовтого забарвлення, а у відновленій формі вітамін B₂ є безбарвним [25].

Хімічна формула рибофлавіну: C₁₇H₂₀N₄O₆. Структурна формула рибофлавіну (7,8-диметил-10-(1-D-рибітил)-ізоаллоксазин) зображена на рис. 2.1.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Гнатюк М.О.				РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	20
						116	
Керівник	Поліщук В.Ю.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затвер.							

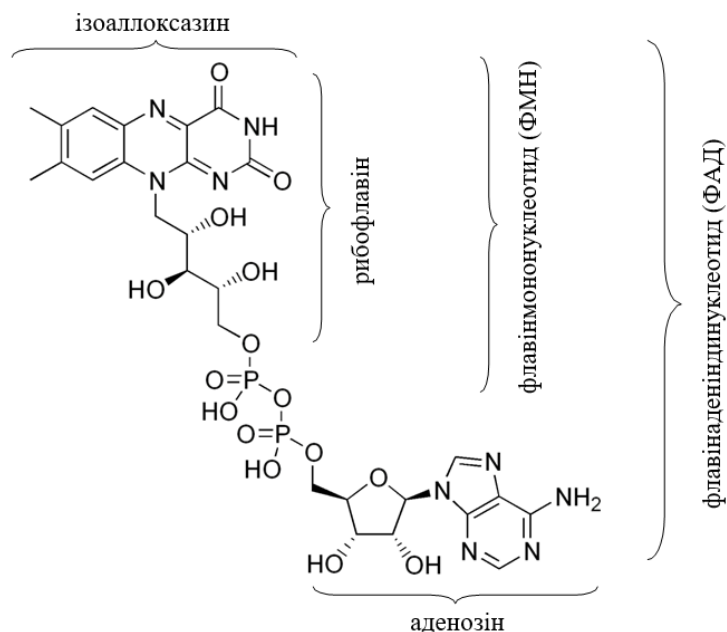


Рис. 2.1 Структурна формула рибофлавіну та флавінових коферментів [4]

Рибофлавін руйнується при УФ-опроміненні, проте практично не руйнується в процесі звичайного приготування їжі. Нерозчинний в жирах та в розчинниках жирів. Погано розчинний у спирті та воді (знижуючи рН можна збільшити розчинність), стійкий у кислих розчинах, проте руйнується у лужних та нейтральних розчинах. Помірно розчинний у льодяній оцтові та мурашиній кислотах, добре розчинний у соляній кислоті [24, 25].

ФАД (флавінаденіндинуклеотид) – біологічно активна форма рибофлавіну, яка синтезується в нирках, печінці та інших тканинах організму людини. В природному вигляді інша похідна рибофлавіну – рибофлавін-5-фосфорна кислота (ФМН), зустрічається у дріжджах, що дає змогу нормально протікати окисно-відновним процесам в організмі [25]. В самих тканинах тварин цей вітамін не синтезується, проте він продукується багатьма мікроорганізмами, які знаходяться в шлунково-кишковому тракті ссавців. В організм людини рибофлавін надходить з харчовими продуктами [26].

При вживанні їжі вітамін B₂ потрапляє в організм у складі наступних продуктів [25, 26]:

- овочі;
- молоко і молочні продукти;
- печінка;
- куряче яйце;
- злаки.

Добова фізіологічна потреба в рибофлавіні невелика і становить 1,5-2,4 мг (збільшується при тяжкому фізичному навантаженні). Систематичне зловживання алкоголем деформує механізм засвоєння В₂, тому в такому випадку потреба у даному вітаміні також підвищена. Крім того, потреба в рибофлавіні зростає при наявності таких захворювань, як гастрит, гепатити, хвороби шкіри, кишківника, очей, недокрів'я [25].

Характерними ознаками, специфічними для авітамінозу В₂, є запальні процеси слизової оболонки язика (глосит), губ, особливо у куточках рота, епітелію шкіри і ін. Найбільш характерні кератити, запальні процеси і посилена васкуляризація рогової оболонки, катаракта (помутніння кришталика). При авітамінозі В₂ у людей розвиваються загальна м'язова слабкість і слабкість серцевого м'яза [23, 24].

Серед сфер застосування рибофлавіну можна виділити наступні:

- з лікувальною метою;
- у харчовій промисловості в якості барвника, для збагачення продуктів харчування (E101);
- у сільському господарстві.

2.2 Схема хімічних перетворень

При потраплянні з їжею у слизовій оболонці тонкого кишківника рибофлавін частково всмоктується в кров методом простої дифузії. В процесі транспорту через мембрани він під дією ферменту флавокінази і АТФ фосфорилується і перетворюється в ФМН, далі в системі транспорту зв'язується з плазматичним альбуміном та надходить у печінку, де в

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

результаті дії ФАД-залежної пірофосфорилази, АТФ й іонів магнію перетворюється на ФАД, що зв'язується з флавіновими протеїнами [24, 27].

Дві коензимні форми рибофлавіну, що являють собою його фосфорні ефіри, ФМН і ФАД є коферментами ряду ферментів дегідрогеназ, що приймають участь в процесах тканинного дихання. При закінченні терміну функціонування в організмі рибофлавін вивільнюється з коферментної форми і піддається біотрансформації, причому одним з його метаболітів є α -оксиетилфлавін. Виводяться метаболіти рибофлавіну із сечею [24].

На рис. 2.2 зображений шлях синтезу рибофлавіну. Попередниками, з яких починається процес, є одна молекула ГТФ та дві молекули рибулози-5-фосфат.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		23

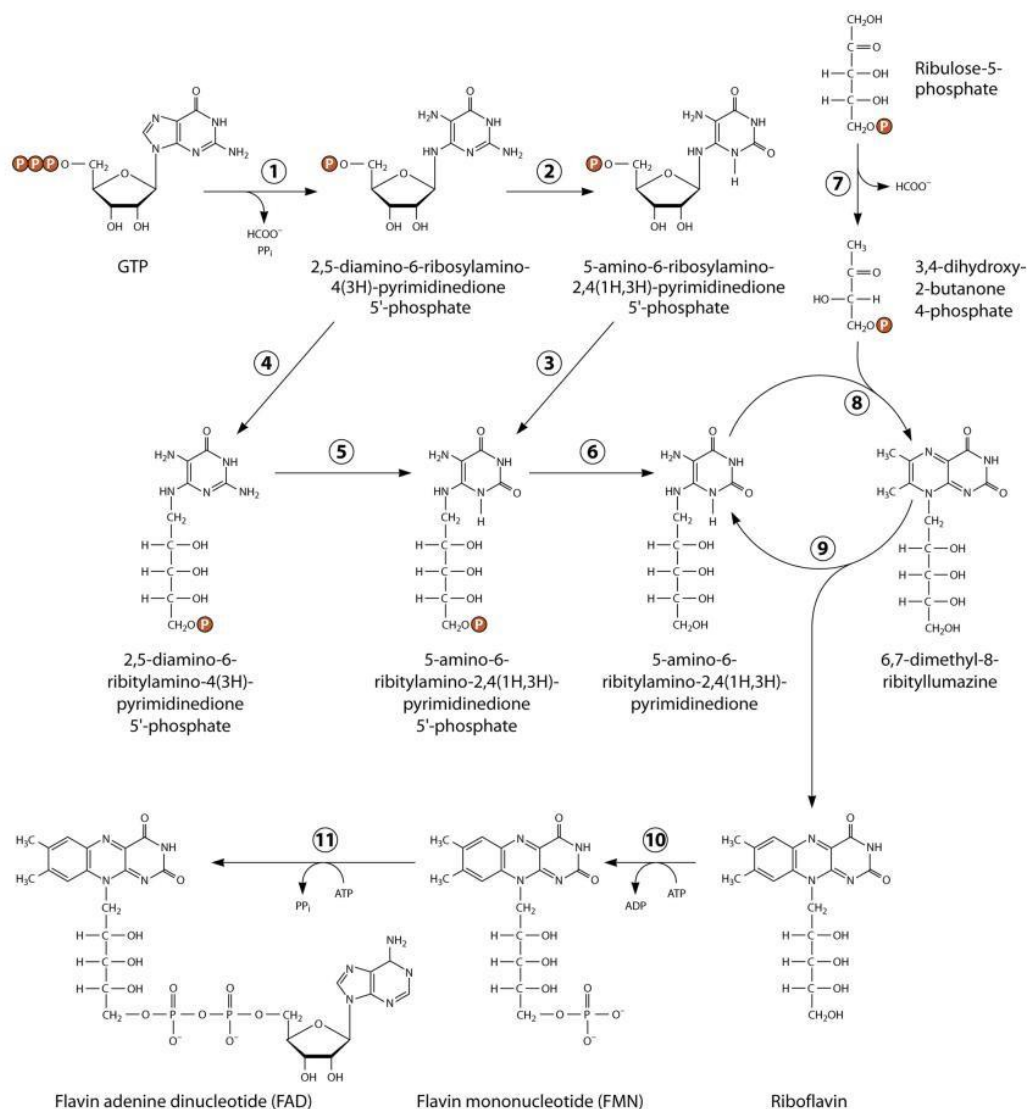


Рис. 2.2 Біосинтез рибофлавіну та флавінових нуклеотидів [28]

1 – ГТФ-циклогідролаза II, 2 – бактерійна деаміназа, 3 – бактерійна редуктаза, 4 – 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4-(3Н)-пиримідинон-5'-фосфат редуктаза, 5 – 2,5- діаміно-6-рибітиламіно-4-(3Н)-пиримідинон-5'-фосфат деаміназа, 6 – фосфатаза, 7 – 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат синтаза, 8 – 6,7-диметил-8- рибітиллюмазин синтаза, 9 – рибофлавін синтаза, 10 – рибофлавін кіназа, 11 – ФАД синтетаза.

Перша реакція біосинтезу рибофлавіну каталізується ГТФ-циклогідролазою II.

Реакція починається з вивільнення пірофосфату, після чого відбувається розкриття імідазольного кільця і елімінація форміату внаслідок

відщеплення ГТФ-циклогідролазою 8-го вуглецевого атому з ГТФ. Продуктом реакції ГТФ-циклогідролази II є 2,5-діаміно-6-рібозіламіно-4(3Н)-піримідиндіонфосфат [28, 29, 30].

Далі у дріжджів та грибів спочатку відбувається відновлення рибозного ядра до рибіту за допомогою редуктази (реакція 4), а потім дезамінування аміногрупи в позиції 2 (реакція 5). У бактерій дезамінування (реакція 2) відбувається перед відновленням рибозного ядра (реакція 3) [4, 28].

Утворений внаслідок реакцій 5-аміно-6-рибітиламіно-2,4(1Н,3Н)-піримідиндіон 5'-фосфат піддається подальшому дефосфорилюванню (реакція 6) з утворенням 5-аміно-6-рибітиламіно-2,4(1Н,3Н)-піримідиндіона, що використовується в реакції люмазин-синтази (наступний етап синтезу рибофлавіну) [28, 31].

Далі піримідиновий попередник рибофлавіну [5-аміно-6-рибітиламіно 2,4 (1Н, 3Н) -піримідиндіон] перетворюється на сполуку птеридину, 6,7-диметил-8-рибітиллюмазин. Перетворення одного кільця піримідинової сполуки до двох птеридинів конденсованого кільця вимагає приєднання 4-вуглецевої сполуки. При дослідженні *P. guilliermondii* було показано, що 4-вуглецевий попередник являє собою 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат, який отримують однією ферментативною стадією з рибулозо-5-фосфату (реакція 7). 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтаза в даний час виділена з багатьох організмів [28, 32, 33].

6,7-диметил-8-рибітиллюмазинсинтаза або люмазинсинтаза каталізує конденсацію 5-аміно-6-рибітиламіно-2,4(1Н,3Н)-піримідиндіона з 3,4 дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатом (реакція 8) [28].

Останній етап каталізується рибофлавін-синтазою. Відбувається реакція двох молекул 6,7-диметил-8-рибітиллюмазину, в процесі якої відбувається обмін 4-вуглецевою одиницею, перетворюючи один з них в рибофлавін, а інший в 5-аміно-6-рибітиламіно-2,4(1Н,3Н)-піримідиндіон, субстрат реакції синтезу люмазину [28].

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Е 101 є рибофлавіном, вітаміном В₂. Ще один його різновид - натрієва сіль рибофлавін-5-фосфат (раніше мав індекс Е106).

Рибофлавін, в першу чергу, володіє позитивним впливом на здоров'я людини: покращує засвоюваність білків і вуглеводів, бере участь в синтезі деяких ферментів, еритроцитів і антитіл; сприяє здоров'ю шкіри, нігтів, волосся і всього організму в цілому. Крім того, він використовується і в якості жовто-помаранчевого барвника.

За результатами досліджень вчених багатьох країн світу було виявлено і негативний вплив Е101 Рибофлавін-5'-фосфат натрію на організм людини:

- призводить до розвитку дисфункції нирок;
- призводить до зниження або різкої втрати зору;
- призводить до розвитку стійких алергічних реакцій.

В таблиці 2.1 наведені технологічні характеристики, властивості, органолептичні показники та норми застосування рибофлавіну, призначеного для використання в харчовій промисловості.

Таблиця 2.1 Характеристика харчового рибофлавіну (Е 101) [34, 35]

Технологічні функції	Барвник (ізоаллоксазиновий), речовина, що сприяє життєдіяльності корисних мікроорганізмів, вітамін.
Синоніми	Вітамін В ₂ , лактофлавин; англ. riboflavine, vitamin B ₂ ; flavaxin; lactoflavin; vitamin G; нім. Riboflavin, Lactoflavin, Vitamin B ₂ ; фр. riboflavine, lactoflavine.
CAS№	83-88-5
EINECS No.:	201-507-1
E No.:	E 101
Хімічна назва	7,8-Диметил-10-(1`D-рибітил)-ізоаллоксазин, 7,8-диметил-10-(D-рибо-2,3,4,5-

	диметиланилина, D-рибози і аллоксана. Домішки: луміфлавін.	
Вміст рибофлавіну, %	FNP 5/7	FCC IV
СВ	98-101	98-101
Втрати при сушінні, %, не більше	FNP 5/7 2	FCC IV 1,5
Сульфатна зола, %, не більше	FNP 5/7 0,1	FCC IV 0,1
Луміфлавін, %, не більше	FNP 5/7 0,025	FCC IV витрим. випр.
Первинні ароматичні аміни (в перерахунку на анілін), мг/кг, не більше	FNP 5/7 100	FCC IV -
As, Pb, мг/кг, не більше	FNP 5/7 -/1	FCC IV 3/10
Метаболізм і токсичність	Вітамін В ₂ приймає участь в обміні жирів, вуглеводів і білків. Велика частина рибофлавіну виділяється з сечею. Біологічна роль рибофлавіну визначається його участю в якості попередника флавінових коферментів, які входять у велике число найважливіших окислювально-відновних ферментів. Добова потреба, відповідно до «Норм фізіологічних потреб в харчових реч-ах і енергії» (1991 р), становить 1,3-2,4 мг. При нестачі рибофлавіну у людини спостерігаються запальні процеси шкіри, слизових оболонок рота й очей (кон'юнктивіт).	
Гігієнічні норми	ДСП 0,5 мг/кг ваги тіла в день. Небезпеки по ГН-98 відсутні.	

	<p>Дозволений в якості барвника в сирах, а також в солоних огірках в кількості до 300 мг/кг індивідуально або в поєднанні з іншими барвниками, в супах і бульйонах в кількості до 200 мг/кг.</p> <p>Дозволений в якості барвника в гіркі содові напої, гірке вино, виготовлені за рецептами, узгодженим з Держсанепіднагляду МОЗ у кількості до 100 мг/л (п. 3.10.8 СанПіН 2.3.2.1293-03); в овочі в оцті, розсолі або маслі, за винятком оливок і в інші продукти згідно ТІ в кількості згідно ТІ (п. 3.10.9, 3.11.3 СанПіН 2.3.2.1293-03).</p>
Застосування	<p>Для збагачення БАД до їжі, спеціалізованих продуктів і напоїв. Для збагачення борошна, рису, макаронів, сухих супів і напоїв, сніданків зі злаків, гірчиці, морозива, і дієтичних і різних сухих харчових продуктів. Для твердих препаратів, для збагачення комбікормів і, в разі гострого дефіциту, додавання в питну воду. Підходить для виготовлення продуктів харчування в порошкоподібної формі, для кондитерських виробів. Виробництво мультівітамінних таблеток, таблеток, желатинових капсул, рідких і сухих харчових продуктів, в тому числі спортивних продуктів харчування. Активний компонент в складах косметичної продукції.</p>
Безпечність	<p>Продукт безпечний при використанні за призначенням. Не містить ГМО. Відповідає чинним законодавчим актам і нормативним вимогам до якості і безпеки, встановленим для даного виду харчової продукції. Показники безпеки:</p>

	Свинець - не більше 5,0 мг/кг
	Миш'як - не більше 3,0 мг/кг
	Кадмій - не більше 1,0 мг/кг
	Ртуть - не більше 1,0 мг/кг

Дані з таблиці 2.1 наведені у відповідності до FNP 5/7 – FAO «Food and Nutrition papers», Compendium of Food Additive Specifications (addendum 7, JECFA, Roma, 2001) та FCC IV – «Food Chemicals Codex. Fourth edition» (Washington, National Academy Press, 1996) – харчовий хімічний кодекс США.

2.4 Методи очистки цільового продукту

У разі необхідності отримання кристалічного рибофлавіну застосовують наступний метод його виділення з культуральної рідини. Кристали рибофлавіну переводять повністю в розчинений стан за рахунок нагрівання і додавання концентрованої соляної кислоти. Гарячий розчин піддають фільтрації (мікрофільтрації до відділення зважених частинок клітин та ін.). Фільтрат охолоджують і в разі потреби додають відновник. Отримані технічні кристали (90-95% вітаміну) піддають перекристалізації з розчину соляної кислоти, органічних розчинників або води. В результаті отримують препарат кристалічного рибофлавіну з вмістом основної речовини не менше 98% [36]. Медичний препарат рибофлавіну отримують перекристалізацією його з розчину технічного рибофлавіну в соляній кислоті [37].

Також запропонований спосіб очищення і кристалізації рибофлавіну, при якому рибофлавін в стабільній модифікації А розчиняють у водному розчині мінеральної кислоти при температурі не $> 30^{\circ}$ при інтенсивному перемішуванні, додають до отриманого розчину активоване вугілля, піддають фільтруванню через керамічну мембрану з розмірами пор 20-200 нм. Одержаний розчин змішують при температурі не вище 30° з 5-10-

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

кратною кількістю води. Кристали рибофлавіну, що випали, відокремлюють центрифугуванням або фільтруванням. Наприклад: розчиняють вихідний матеріал (з вмістом 97,02% рибофлавіну і залишковою кількістю води 0,8%) (350 г) в 1708,6 г 24% соляної кислоти при 22°C, через 15-20 хв отримують коричнево-чорний розчин, що містить 17% рибофлавіну. Додають 16 г активованого вугілля, перемішують 4 год, поміщають суміш в пристрій для мембранного фільтрування з подвійною сорочкою, охолоджують таким чином, щоб температура не піднімалася вище 35°C. За допомогою центрифужного насоса продавлюють розчин через керамічну мембрану з ефективною поверхнею 0,0055 м², трансмембранний тиск становить 1,5 бар (0,15 МПа), швидкість проходження через мембрану становить 6 м/с, продуктивність - 100 л / м² / год. Додають до 3 л розчину з кристалами рибофлавіну у вигляді затравки 2 л води, фільтрують через подвійний паперовий фільтр, охолоджують при 10°C. Дозують зі швидкістю 1590 г/год розчин рибофлавіну (після фільтрування через мембрану) і воду зі швидкістю 9000 г/ год при 10°C, через 2-4 хв починається кристалізація рибофлавіну у вигляді оранжево-жовтих кристалів, які через 20-30 хв формуються в частинки, суспензію фільтрують, осад промивають водою при рН 5, сушать [38].

2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Вітамін В₂ є важливим елементом в нормальному функціонуванні людського організму, приймає участь в окисно-відновних процесах. В організмі рибофлавін фосфорилується, перетворюючись в коферменти: флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД), входить у склад основних дихальних ферментів, за допомогою яких здійснюється тканинне дихання [11, 18]. В процесах метаболізму він у складі флавінових ферментів здійснює реакції дегідрування, а біокаталітичне дегідрування флавіновими коферментами є лише ланкою в ланцюгу окисно-відновних

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

процесів, в якій відновлена форма ферментів піддається окисленню (відновлення дегідруючих властивостей) [27]. Окислювально-відновні властивості флавінів обумовлені наявністю в складі молекули системи, здатної до оборотного окислення і відновлення (рис. 2.3) [39].

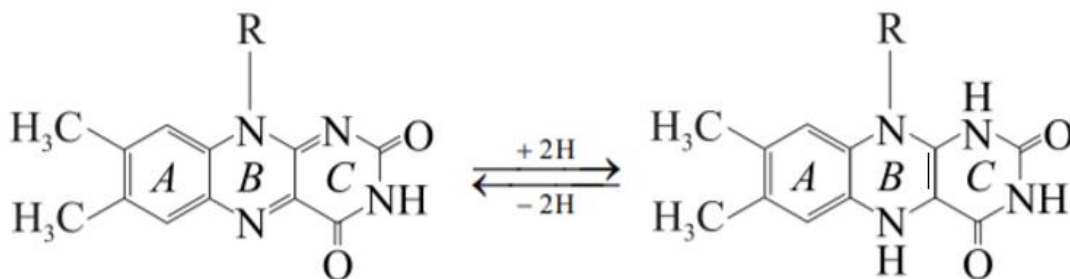


Рис. 2.3 Окислювально-відновні властивості флавінів [39]

Також вітамін В₂ відіграє роль в окислювальному дезамінуванні амінокислот і біосинтезі гемоглобіну та інших процесах. Рибофлавін сприяє інтенсифікації процесу обміну речовин в організмі, тобто метаболізму білків, жирів та вуглеводів. В₂ є необхідним для утворення еритроцитів і антитіл, для клітинного дихання і росту. З його допомогою поглинання О₂ клітинами шкіри, нігтів і волосся полегшується. Більш того, рибофлавін позитивно впливає на оболонки травного тракту [25, 26].

Крім того, стан органу зору покращується в присутності рибофлавіну, так як разом з ретинолом (вітамін А) він приймає участь в процесах темної адаптації, знижується втома очей. Також сприяє запобіганню розвитку катаракти [23, 25]. Завдяки своїй світлочутливості рибофлавін перетворює фіолетові і сині промені, що на нього діють, в більш довгохвильові (світло зеленої флюоресценції), до яких око має більшу чутливість. Отже, можна сказати, що вітамін В₂ виконує роль сенсibilізатора зору, що дозволяє лікувати деякі хвороби очей за допомогою рибофлавіну [27].

В останні роки було встановлено, що вітамін В₂ є ефективним при лікуванні мігрені [26], малярії [27] та хвороби Паркінсона [28]. Встановлено, що рибофлавін має клінічно важливий вплив на зниження артеріальної гіпертензії [29].

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

Рибофлавін або вітамін В₂ є молекулою-попередником коферментів, флавінмононуклеотида (ФМН) і флавінаденіндинуклеотида (ФАД). Він синтезується бактеріями, грибами і рослинами, але не людиною та іншими моногастральними організмами. Хоча рибофлавін може бути синтезований хімічно, більш вигідним є мікробний синтез певними бактеріями і грибами. В даний час близько 75% з 4000 тон виробництва рибофлавіну проводиться шляхом використання мікроорганізмів [40].

Серед аскоміцетів *Eremothecium ashbyi* і *Ashbya gossypii* є активними суперпродуцентами рибофлавіну і являють собою ниткоподібні гриби [41]. На відміну від бактерій і дріжджів, обидва переносять наявність заліза в середовищі та можуть використовуватися в промислових процесах [42]. Культивування *Eremothecium ashbyi* можна проводити на дешевих відходах агропромислового комплексу, таких як меляса, молочна сироватка і т.д. Дані організми є рослинними патогенами і є тісно пов'язаними філогенетично [43]. Однак *E. ashbyi*, на відміну від *A. gossypii*, продукує фармацевтично важливий ФАД, що 1000 разів дорожче рибофлавіну [40]. Інша перевага полягає в тому, що збагачений бульйоном *E. ashbyi* корм для тварин значно сприяє їх здоровому розвитку [44]. Варто зазначити, що в середовищах, що містили сироватку, були отримані більш високі виходи рибофлавіну з *E. ashbyi* ніж з *A. gossypii*. Однак, лише для *A. gossypii* були розроблені генетичні трансформанти, що дають більш високий рівень рибофлавіну, і не було опубліковано жодних інструментів для молекулярних досліджень

					ДП 6204. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Гнатюк М.О.			РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	33	116
Керівник		Поліщук В.Ю.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

E. ashbyi. Отже, існує підвищений інтерес до поліпшення *E. ashbyi* для ферментативного виробництва за допомогою генетичних маніпуляцій [40].

3.1.1 Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи

У *E. ashbyi* були секвеновані тільки певні гени, пов'язані з його філогенією [43], а інформація про генетичну структуру метаболічних генів у *E. ashbyi* відсутня. Нещодавно було проведено секвенування деяких важливих метаболічних генів, що кодують GTP-ціклогідролазу II (GCH II) [45], гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу (GPD) [46] і піруваткіназу в *E. ashbyi*. [47]. Філогенетичне дослідження з зазначеними вище послідовностями гена *E. ashbyi* підтвердили, що він є філогенетично найбільш близьким до *A. gossypii* (рис. 3.1).

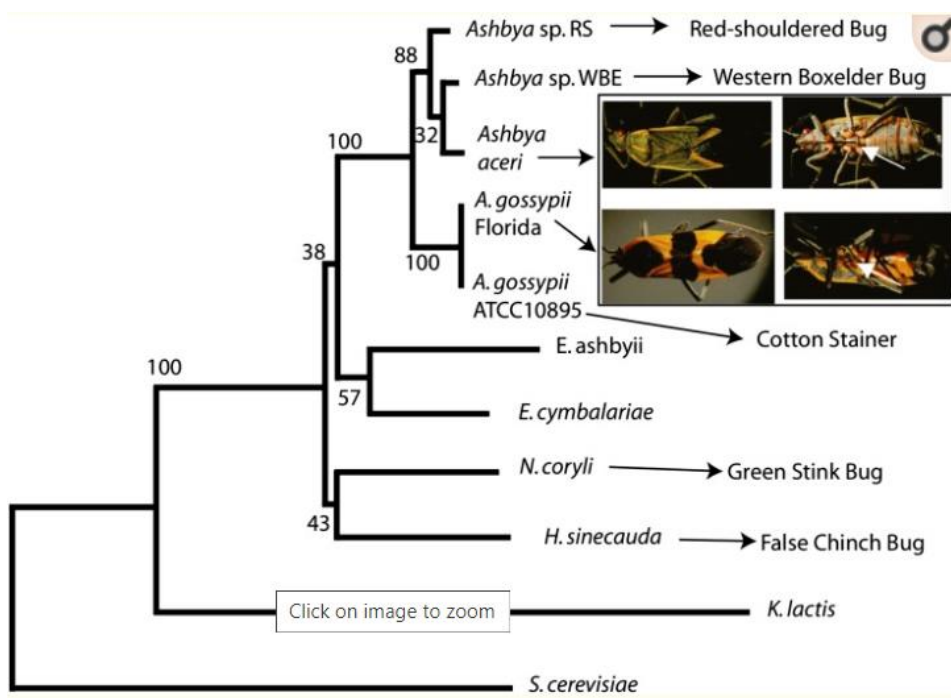


Рис. 3.1 Гриби, найтісніше пов'язані з *A. gossypii* [48]

A. gossypii є генетично змінюваним організмом, на відміну від *E. ashbyi*. Отже, конструювання реплікативних конструкцій з геномних клонів *A. gossypii* і аналіз їх функціональності в *E. ashbyi* матимуть першорядне

значення для ініціювання генетичних досліджень в цьому генетично не охарактеризованому організмі [40].

Як зазначалося раніше, *E. ashbyi* не є генетично достатньо вивченим організмом, проте його філогенетична близькість до дослідженого *A. gossypii* дає змогу порівнювати і використовувати знання про його геном для подальшого вивчення більш вигідного в промисловому застосуванні *E. ashbyi*.

Дослідження молекулярної біології, залученої у виробництво рибофлавіну, що багато років вивчалася у *A. gossypii*, призвели до виявлення шляхів, необхідних для забезпечення ГТФ як центрального попередника біосинтезу рибофлавіну. *Eremothecium ashbyi* і *A. gossypii* є флавіногенними видами з точки зору їх здатності до синтезу рибофлавіну, тоді як *E. cymbalariae* такою здатністю не володіє [49].

До недавнього геномного секвенування *Eremothecium cymbalariae*, геном *A. gossypii* був єдиним секвенованим геномом грибів виду, пов'язаного з дріжджами, здатними до брунькування, що ростуть в строго нитчастому режимі з багатоядерними і багато розгалуженими гіфами [49].

Нитчастий гриб *Ashbya gossypii* є привабливою моделлю для дослідження ниткоподібного росту через його невеликий геном, гаплоїдні ядра, ефективного націлювання на гени, поширення плазмід і росту в певних середовищах. Геномний проект *A. gossypii* було розпочато, коли було помічено збереження порядку і орієнтації генів (синтенію) до *Saccharomyces cerevisiae* [50].

Послідовність генома штаму *A. gossypii* (ATCC10895) показала більш 90% синтаксису анотованих білок-кодуючих генів з набором генів *S. cerevisiae* (рис. 3.2). Жовтий і червоний прямокутники представляють собою відкриті рамки зчитування (ORF) 267-294 правого плеча хромосоми 7 *A. gossypii* ATCC10895 і ізоляту 1 комахи, відповідно. Темно-сірі і світло-сірі прямокутники представляють ORF *S. cerevisiae* з правого плеча хромосоми XV (вгорі) і лівого плеча хромосоми XII (внизу), які є синтенічними для ORF

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

A. gossypii. Відкриті трикутники показують напрямки транскрипції, а заповнені накінечники стрілок відмічають ORF Інтроном. Відкриті квадрати - це гени тРНК, а закриті квадрати - маленькі гени ядерної РНК. Порядок генів зберігається між двома штамами *A. gossypii*, а також довжинами ORF (кількість кодонів) і розмірами областей між ORF (кількість пар основ). Синтенія з *S. cerevisiae* розділена між двома хромосомними областями. Під час дуплікації генома *S. cerevisiae* обидві області показали повну синхронність з порядком генів *A. gossypii*. В ході еволюції багато з дубльованих генів втратили одну копію, яку видно як вільні від ORF області на цій карті синтенії. Карта синтенії також показує шість випадків (п'ять ORF і один ген тРНК), де обидві копії дублювання зберігаються. Щоб відрізнити ці дуплікації від тандемних дуплікацій, був введений термін «близнюкові гени» [48, 50].

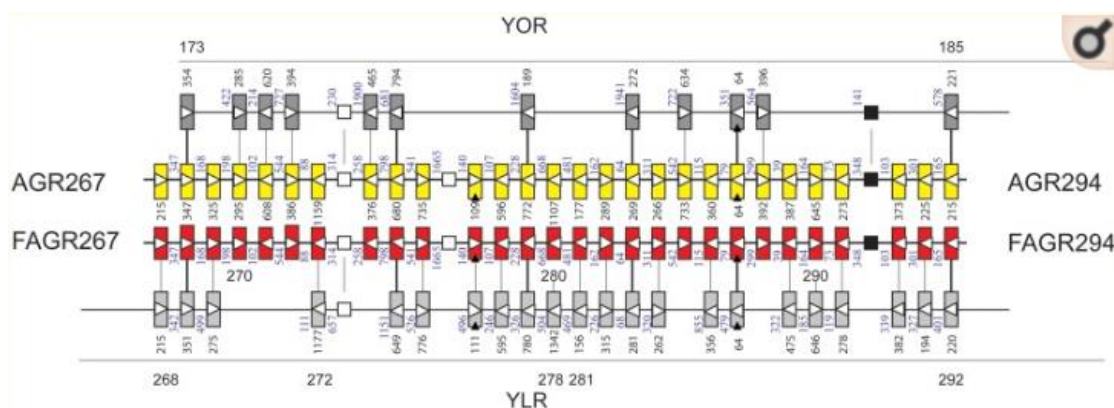


Рис. 3.2 Синтенія між ортологічними хромосомними областями *A. gossypii* і *S. cerevisiae* [48]

Сім хромосом кодують 4718 білків, 199 генів тРНК і 49 генів малих ядерних РНК (snRNA). Рибосомальна ДНК несе 40 копій генів рибосомальної РНК, секвенованих раніше.

У геномі відсутні транспозони і субтеломерні генні повтори, а дуплікації генів рідкісні. Кількість генів, кодуючих білок, схожа з 4824 генами, знайденими в *Schizosaccharomyces pombe*, що дозволяє припустити, що це значення може бути близьким до мінімальної кількості генів, необхідних для вільно живучого гриба. Геном надзвичайно компактний із

середньою відстанню між відкритими рамками зчитування всього 341 пар основ, що сприяє середньому розміру білок-кодуючого гена всього 1,9 т.п.н., що явно менше середнього розміру генів в 2,1 т.п. н., виявленого у *S. cerevisiae* , 2,5 кб, виявлених у *S. pombe*, і 3,7 кб, виявлені у *Neurospora crassa* [50]. Наявність всього 221 інтрона у всьому геномі *A. gossypii*, багато з яких знаходяться в ідентичних положеннях у гомологів *S. cerevisiae*, також сприяє компактній природі цього генома. *A. gossypii* і *S. cerevisiae* розійшлися у розвитку понад 100 мільйонів років тому, і їх геноми суттєво відрізняються за вмістом гуаніну та цитозину (52% для *A. gossypii* і 38% для *S. cerevisiae*). Проте, для 95% білок-кодуючих послідовностей *A. gossypii* виявлено гомологи в геномі *S. cerevisiae*, більшість (4281 ORF) в синтенійних місцях. Тільки 175 генів, що кодують білок *A. gossypii*, продемонстрували гомологію, але не синтенію з генами *S. cerevisiae*, а 262 гомології не мають. Кілька генів без гомологів у *S. cerevisiae* мають гомологів у *S. pombe*, що підтверджує ідею про те, що вони є реальними генами, яких не було або більше немає у *S. cerevisiae* [50].

Збереження білкової послідовності між синтенічними гомологами *A. gossypii* і *S. cerevisiae* значно варіюється, змінюючись від менш ніж 20% ідентичності амінокислот до майже 100%. Більше 90% генома *A. gossypii* можна розділити на кілька сотень синтенійних груп. У кожній з цих груп співвідношення гомології окремих генів або підгруп генів чергувалось між двома областями *S. cerevisiae* і *A. gossypii*. Цю модель прийнято називати подвійною синтенією. Відносно простий приклад подвійної синтенії показаний на рис. 3.1.1.3 (А). У цій групі тридцять три послідовних гена І хромосоми, кодуючих білок *A. gossypii*, що фланковані двома генами тРНК, поєднуються з областями послідовних генів з хромосом XVIII і XVI *S. cerevisiae*. Гомологічні відкриті рамки зчитування зазвичай мають консервативну довжину [50].

Патерн подвійної синтенії відображає порядок генів самого останнього спільного пращура і зміни в цьому порядку через перебудову генома в обох

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

лініях, зокрема втрати багатьох генів в лінії *S. cerevisiae* після дуплікації генома. Це дозволяє відносно легко реконструювати стародавні порядки генів *S. cerevisiae* рис. 3.3 (Б). На цій стародавній карті синтенії білок-кодуючі гени представлені у вигляді прямокутників, а синтенічні гомологи з'єднані вертикальними смугами. Всі розриви, що виникають між генами *S. cerevisiae* в цьому типі подання, вказують позиції під час дуплікації генома колишніх гомологів, які згодом були втрачені.

Порядок генів *A. gossypii* також дозволив знайти інверсії, які відбулися в лінії *S. cerevisiae*, наприклад, в хромосомі XVI (рис. 3.3 (Б)), тому що вирівнювання гомологів показує їх порядок до інверсії. Цей древній порядок генів показує один розрив синтенії між YPL176C і YPL170W. Інша точка переривання цієї інверсії збігається з подвійним порушенням синтенії (чорні стрілки): дві інші області гена *S. cerevisiae* мають загальну гомологію і синтенію з вісьмома ORF *A. gossypii*, проксимальними до AAL119W. Більшість таких подвійних розривів синтенії не збігаються з одиничними розривами, і більшість з них відзначають кінцеві точки інверсій або транслокацій в еволюційному минулому *A. gossypii* або *S. cerevisiae* до дублювання генома. Геном *A. gossypii* часто несе гени тРНК (незафарбовані квадрати) або не синтенійні гомологи (сині прямокутники) в таких кінцевих точках перегрупувань, як показано на рис. 3.3. Присутність генів тРНК в таких сайтах можна пояснити відсутністю інших повторюваних елементів ДНК у *A. gossypii*, що перемежуються, і, отже, гени тРНК слугували сайтами для гомологічно-індукованих перебудов [50].

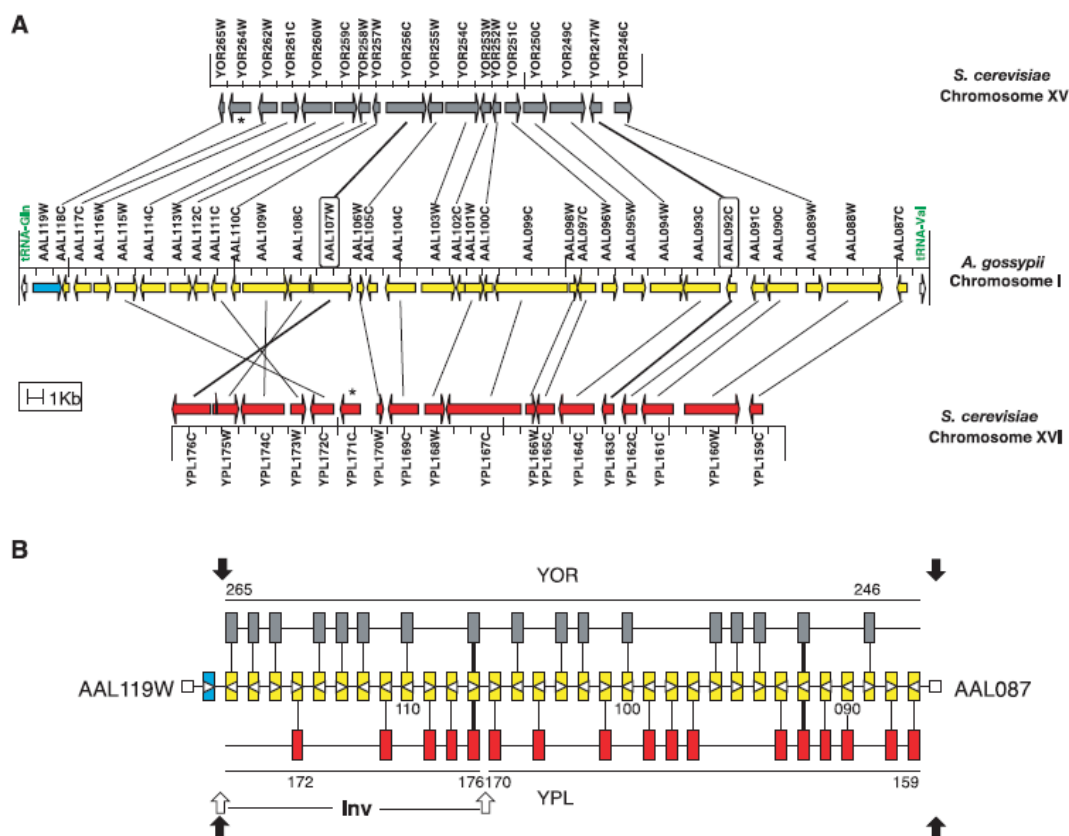


Рис. 3.3 Простий шаблон подвійної синтенії і його перетворення в древню карту синтенії [50]

(A) Подвійна синхронія між ORF *A. gossypii* AAL119W по AAL087C і двома областями *S. cerevisiae*, ORF YOR265W по YOR246C і YPL176C по YPL159C відповідно. Стрілки являють собою розміри і орієнтацію ORF і зображені в масштабі. ORF, класифіковані як Watson, можуть з'явитися після подій перестановки як ORF Stick і навпаки. Лінії з'єднують пари гомологів з товстими лініями, що відзначають близнюкові ORF *S. cerevisiae*, що походять з дуплікації генома. Пересічні лінії вказують на інверсію п'яти генів.

(B) Давня карта синтенії. ORF представлені у вигляді прямокутників, а гени тРНК - у вигляді квадратів. Синтенічні гомологи пов'язані вертикальними полосами і, в разі подвійних ORF, товстими вертикальними полосами. Орієнтація транскрипції позначена білими стрілками тільки для ORF *A. gossypii*, оскільки синтологічні гомологи *S. cerevisiae* транскрибуються в одному і тому ж напрямку. Тонкі лінії вище і нижче генів *S. cerevisiae* відзначають найбільш ймовірну ступінь синтенічних генів в той

час, коли геном попередника *S. cerevisiae* дубльований. Ці лінії перериваються, коли древній порядок генів більше не є колінеарним з нинішнім порядком генів, як у випадку YPL176C і YPL170W. Такі контрольні точки давньої синтєнії (стрілки) позначають кінцеві точки інверсій або транслокацій.

Приклад стародавнього генного порядку, реконструйованого за складною схемою подвійної синтєнії, показаний на рис. 3.4 для області центромери хромосоми I *A. gossypii*. Центральнопроксимальні гени демонструють гомологію та синтєнію до центромерних областей хромосом III *S. cerevisiae* (область YCL до YCR) та XIV (область YNL до YNR). Дублювання цих двох областей було запропоновано 10 років тому і ретельно проаналізовано після завершення генома *S. cerevisiae*. Інші гени в області центромери I *A. gossypii* демонструють гомологію і синтєнію до двох коротких ділянок хромосоми XII *S. cerevisiae* (YLR) і до дуже короткої ділянки хромосоми VII *S. cerevisiae* (YGL). Знову ж таки, всі розриви між генами *S. cerevisiae* зазначають сайти колишніх гомологів під час дуплікації генома, які були втрачені в ході еволюції. Вирівнювання гомологів *S. cerevisiae* виявило вісім порушень синтєнії в порівнянні з сьогоdnішнім геномом *S. cerevisiae* (14). Ці розриви походять від трьох реципрокних транслокацій (Tra) і однієї інверсії (Inv) в *S. cerevisiae* після дуплікації генома (білі стрілки) і від однієї інверсії (чорні стрілки) в лінії *A. gossypii* (або лінії *S. cerevisiae* перед дублюванням генома) [50].

По суті повне покриття семи хромосом *A. gossypii* кластерами древньої синтєнії, кожен з яких містить дві області гена *S. cerevisiae*, показує, що обидва організми походять від одного і того ж пращура з сімома або вісьмома хромосомами. Видоутворення, що ймовірно залучає транслокації і супроводжує зміну числа хромосом, дало початок попередникам *A. gossypii* і *S. cerevisiae*. Через деякий час дублювання генома у попередника *S. cerevisiae* відкрило нові можливості для функціональної дивергенції, недоступної для еволюції *A. gossypii*.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

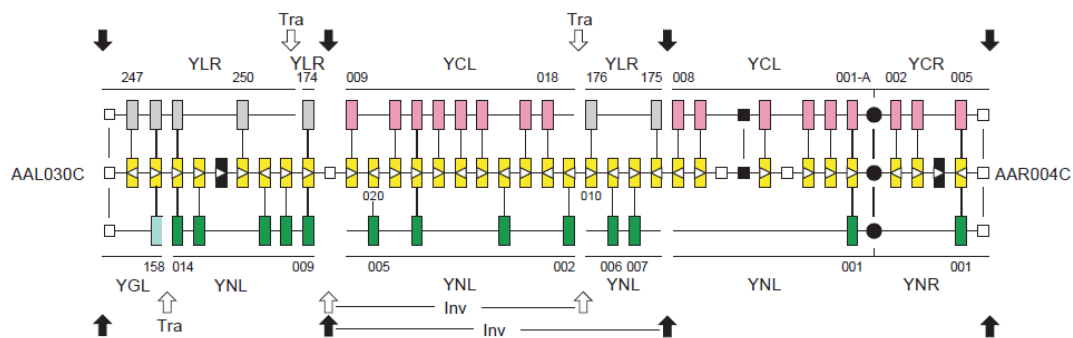


Рис. 3.4 Множинні перестановки в давній центромерній області *A. gossypii* [50].

ORF *A. gossypii* AAL030C-AAR004C пов'язані вертикальними лініями з тими ORF *S. cerevisiae*, які кодують гомологічні білки. Всі ORF, які беруть участь в цьому шаблоні, класифікуються в записах GenBank як синтенічні гомологи. Вони походять з хромосом III *S. cerevisiae* (YCL і YCR), VII (YGL), XII (YLR) і XIV (YNL і YNR). На додаток до гомологічних ORF, гомологи до двох фланкуючих генів тРНК *A. gossypii* (відкриті квадрати), до одного гену snRNA (чорні квадрати) і центромерам (чорні кола) були ідентифіковані в синтенічних областях *S. cerevisiae* і з'єднані лініями. Чорні прямокутники представляють два з 262 ORF *A. gossypii*, які не мають гомолога у *S. cerevisiae*. Напрямок транскрипції позначений білими стрілками, ідентично в синтенічних ORF *S. cerevisiae*. Тонкі горизонтальні лінії вище і нижче генів *S. cerevisiae* зазначають ступінь стародавньої синтенії, що впливає з реконструкції делеції генів і перебудови генома. Основна складність полягає в призначенні решт цих ліній у випадках значних втрат генів, наприклад, між YNL001W і YNL007C. Ці випадки рідкісні, і остаточне рішення засноване на реконструкції найбільш ймовірних подій перебудови, які перервали початковий порядок генів. Кінцеві точки таких подій відзначені білими стрілками, коли зачіпається порядок генів в одному з двох синтенічних регіонів *S. cerevisiae* (поодинокі розриви синтенії), і чорними стрілками, коли зачіпаються обидва порядку генів (подвійні розриви синтенії).

Основна складність полягає в призначенні кінців цих ліній у випадках значних втрат генів, наприклад, між YNL001W і YNL007C. Ці випадки

рідкісні, і остаточне рішення засноване на реконструкції найбільш ймовірних подій перебудови, які перервали початковий порядок генів. Кінцеві точки таких подій відзначені білими стрілками, коли зачіпається порядок генів в одному з двох синтенийних регіонів *S. cerevisiae* (поодинокі розриви синтениї), і чорними стрілками, коли зачіпаються обидва порядки генів (подвійні розриви синтениї).

3.1.2 Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.

Eremothecium ashbyi - ниткоподібний гриб та суперпродуцент рибофлавіну, в якому метаболічні шляхи генетично охарактеризовані. Встановлено два гена шляху біосинтезу рибофлавіну (RIB) RIB1 і RIB3, які кодують GTP-ціклогідролазу II (GCH II) і 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат (DHBP) синтазу відповідно [40].

Біосинтез рибофлавіну в *A. gossypii* протікає через шість стадій, що каталізують ферментами, кодованими біосинтетичними рибофлавіновими генами (RIB) 1eRIB5 і RIB7 [51]. Гени RIB1 і RIB3 кодують GCH II і 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат (DHBP) синтазу відповідно, які каталізують початкові шляху біосинтезу рибофлавіну, що обмежують швидкість стадії. GCH II гідролізує GTP з утворенням, 2,5-діаміно-6-рібозіламіно-4 (3H) - пірімідінон-50-фосфату (DARPP) і дифосфату. RIB3 кодує DHBP-синтазу, яка перетворює рибулозо-5-фосфат в форміат і 3,4-дігідроксібутанон-4-фосфат. Всі послідовності гена RIB у *A. gossypii* відомі [50].

Гліюксилатний цикл - це анаболічний шлях, необхідний для росту в таких важко ферментованих джерелах вуглецю, як рослинні олії, і важливий для виробництва рибофлавіну нитчастим грибом *Ashbya gossypii*. Було проведено дослідження з виявлення малат-синтази в гліюксилатному циклі *A. gossypii* та дослідження її значення у виробництві рибофлавіну з реп'яхової олії. Ген ACR268C був ідентифікований як ген малат-синтази,

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		42

який кодував функціональну малат-синтазу в гліоксилатному циклі. Мутантний з відсутністю гена ACR268C втратив активність малат-синтези, а його виробництво рибофлавіну та споживання олії відповідно були в 10 та 2 рази нижчими, ніж значення штаму дикого типу. Навпаки, штам зі підвищеною експресією гена ACR268C демонстрував у 1,6 рази збільшення активності малат-синтази та в 1,7 рази вище продукування рибофлавіну, ніж контрольний штам. Ці результати свідчать про те, що малат-синтеза в циклі гліоксилатів відіграє важливу роль не тільки у виробництві рибофлавіну, але й у споживанні олії [52].

Так як продукування рибофлавіну в *A.gossypii* можна стимулювати додаванням олії, то активація циклу гліоксилатної кислоти відіграє важливу роль і збільшенні накопичення вітаміну B₂. Ізоцитрат-ліаза є ключовим ферментом при біосинтезі рибофлавіну з олій, тобто в гліоксалатному циклі. Мутанти, у яких активність даного ферменту вища, в порівнянні з дикими штамми, продукують більшу кількість вітаміну B₂ [4, 52]. Так як активність ізоцитрат-ліази пригнічується ітаконатом, то важливим є отримання мутантів, стійких до ітаконату, що здатні виробляти підвищені рівні рибофлавіну [53, 54]. Проте точний характер цих мутацій не є вивченим. Посилення виробництва рибофлавіну досягається перенаправленням потоку карбону з циклу трикарбонових кислот через гліоксилатний цикл [4].

Гуанозин трифосфат (GTP) циклогідролаза II, кодована геном RIB1, каталізує ступінь обмеження швидкості біосинтетичного шляху рибофлавіну. Виявлено антагоністичну дію міо-інозитулу на виробництво рибофлавіну у *A.gossypii* та *E. ashbyi*, шляхом адаптації їх у середовищі дріжджового солодового агару, що містить 0,1% інозитулу. Адаптований *E. ashbyi* показав зниження продукування рибофлавіну на 92%, а адаптований *A.gossypii* показав на 39% збільшення загального виробництва рибофлавіну. Дослідження ланцюгової реакції зворотної транскрипції-полімерази (RT-PCR) показало, що міо-інозитол знижує експресію гена RIB1 у адаптованому *E. ashbyi*, але посилює її в адаптованому *A.gossypii* [55].

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

За допомогою додавання ненасичених жирних кислот можна стимулювати біосинтез рибофлавіну. В той же час, додавання насичених жирних кислот уповільнює його утворення. Розвиток *E. ashbyi* можна стимулювати шляхом додаванням біотину, тіаміну, інозиту. Так як піримідинові та пуринові основи – попередники утворення рибофлавіну, то їх також можна використовувати для його більш інтенсивного біосинтезу. Відомо, що ксантин вважається найкращим стимулятором [1, 17].

Крім того, важливим для стимуляції синтезу рибофлавіну є підбір компонентів поживного середовища для культивування *A.gossypii* та *E. ashbyi*. Виявлено, що додавання дріжджового екстракту і глюкози збільшує синтез рибофлавіну, проте великі концентрації, навпаки, можуть його інгібувати. Тому було розроблено технологію подання цих компонентів у ферментер у вигляді підпитки, контролюючи їх концентрацію, що дало змогу значно збільшити синтез вітаміну B₂ (на 104,77%) [56].

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

В наш час активно проводяться дослідження розробки продуцентів, з більш високою здатністю продукування вітаміну B₂ шляхом покращення компонентів поживного середовища та створенням мутантних штамів. Методи, що використовувалися для отримання штамів, здатних до надсинтезу рибофлавіну, включали застосування УФ-опромінення, індукованого мутагенезу, антиметаболітного мутагенезу та генно-інженерних підходів [4].

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

3.2.1 Використання штучного добору для отримання промислових продуцентів

Селекція мікроорганізмів (в основному бактерій і грибів) заснована на експериментальному мутагенезі і відборі найбільш продуктивних штамів, генетично ідентичних клітин - клонів. Після виділення з дикого штаму мікроорганізмів, що володіють корисними властивостями, проводиться відбір найбільш продуктивних штамів серед них.

Наступний етап, як правило, - застосування штучного мутагенезу, що дозволяє посилити появу різних мутацій. В якості мутагенів використовуються іонізуюче випромінювання, деякі хімічні речовини, а також ультрафіолетове випромінювання, що володіє хоча і низькою проникаючою здатністю, але достатньою для появи мутацій у мікроорганізмів.

Для отримання культури мікроорганізмів-мутантів з потрібними якостями вченими-селекціонерами розроблені спеціальні методи відбору. Відібраний клон піддається багаторазовому пересіванню на поживне середовище з контролем на утворення необхідного продукту. Мета такого багаторазового клонування - отримання найбільш однорідної популяції клітин. Після отримання продуктивних штамів приступають до їх розмноження.

Використання даної технології дозволило селекціонерам одержати штами, продуктивність яких в сотні і тисячі разів вище в порівнянні з вихідними штамами мікроорганізмів, взятими з природи [57].

Для даного продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* при підготовці посівного матеріалу на першому етапі проводять оновлення вихідної культури на агаризованих середовищах. Так як даний продуцент є нестабільним при зберіганні, розсів культури на щільні середовища, та відбір колоній, забарвлених у яскраво жовтий колір, які і використовуються для подальшого отримання посівного матеріалу, є основною вимогою вдалого

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

синтезу рибофлавіну.

Тобто, для підтримки культури *Eremothecium ashbyi* в активному стані, на першому етапі підготовки посівного матеріалу, необхідно здійснювати підтримуючу селекцію, відбираючи для подальших досліджень найбільш пігментовані колонії продуценту [4].

Крім того, відомо, що *E. ashbyi* є чутливим до дії сонячних променів і в природних умовах, в якості захисної реакції на їх дію, даним грибом здійснюється надсинтез рибофлавіну [58]. Тому дослідники запропонували здійснювати УФ-опромінення міцелію продуценту, що разом з підтримуючою селекцією дає змогу підвищити синтез рибофлавіну на 70-80% [4].

3.2.2 Використання індукованого мутагенезу.

Надсинтез рибофлавіну *E. ashbyi* було виявлено Guilliermond і його колегами в 1935 році. Отже, оскільки він є суперпродуцентом рибофлавіну, протягом декількох десятиліть над *E. ashbyi* була проведена велика робота [59].

За допомогою УФ-опромінення *Eremothecium ashbyi* DT1 були отримані високо флавіногенний мутант (UV-18-57) та нефлавіногенний мутант(UV-85).

Спочатку отримали дикий тип *Eremothecium ashbyi* 1363 з National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR), Illinois, U.S.A. З нього був виділений флавіногенний штам *Eremothecium ashbyi* DT1 за допомогою посіву на картопляний агар з декстрозою, що містить 0,1% дитіоніту натрію. Дитіоніт натрію дозволяє легко відбирати жовті флавіногенні колонії. Шляхом повторного ультрафіолетового мутагенезу міцелію *Eremothecium ashbyi* DT1 у стерильній дистильованій воді (УФ-пробірка Phillips потужністю 15 Вт на відстані 15 см та експозиції 60-120 сек), були отримані високофлавіногенний мутант (UV-18-57) та нефлавіногенний мутант (UV -

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

85). Культури (DT1, UV-18-57 та UV-85) підтримували на скошених картопляних агарах з декстрозою (PDA), що містили (г / л): картопляне пюре, 200,0; декстроза, 20,0 та агар, 20,0, культивували протягом 5 днів при 30°C, зберігали при 4°C і пересівали один раз на ніч. Міцелій, що отримали зі скошеного агару був інокульований в 50 мл середовища глюкозо-пептонно-дріжджового екстракту (ГПД) (у колбу на 250 мл бурштинового кольору), що містило (г/л): глюкоза, 20.0, пептон, 10.0, дріжджовий екстракт, 4.0. Вихідне рН середовища було доведено до 6.0, використовуючи 1 N NaOH перед стерилізацією. Культури інкубувалися 48 год при 30°C на обертовому шейкері при 200 об / хв. Міцелій з бульйону ГПД переносили (1%) на 50 мл середовища глюкозо-пептон-дріжджового екстракту мінеральної бази (ГПДМБ) (у колбі з бурштиновим кольором на 250 мл), що містить (г / л): глюкоза, 30,0; пептон, 8,0; дріжджовий екстракт, 2,0; KH_2PO_4 , 2,0; NaCl, 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1; і Tween-80, 1,8%. Початкове значення рН середовища доводили до 6,0 за допомогою 1 N NaOH перед стерилізацією. Культури інкубували протягом 7-8 днів, як зазначено вище. У різні часові інтервали міцелій забирали фільтруванням через фільтр G2, промивали і спостерігали вологі скупчення (без фарбування) під мікроскопом світлового поля.

Позаклітинний рибофлавін: культуральний бульйон після фільтрування через фільтрувальний папір Whatman, переміщали у кожну з двох пробірок з маркуванням А і В. По одному мл робочого стандартного розчину рибофлавіну додавали в пробірку А і додавали 1 мл дистильованої води в пробірку В. Розчини потім підкислювали додаванням льодової оцтової кислоти (1 мл). Потім додавали 0,5 мл 4% (мас. / Об.) KMnO_4 для окислення домішок. Рівно через 2 хв в обидві пробірки додавали 0,5 мл 3% розчину H_2O_2 для знебарвлення розчинів. Флуоресценцію розчинів вимірювали за допомогою флюорометра з первинними фільтрами 366 нм та вторинними фільтрами 475 нм (Elico CL-53). В пробірку В, додавали близько 10 мг дитіоніту натрію і вимірювали флуоресценцію протягом 10 секунд.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

Рибофлавін вимірюється у вигляді різниці між флуоресценцією до і після хімічного відновлення дитіонітом натрію.

Внутрішньоклітинний рибофлавін: висушений міцелій разом з фільтрувальним папером подрібнюють дрібними шматочками в 0,02 N HCl, автоклавують при 121°C протягом 20 хв і центрифугують при 3000 об / хв. Рибофлавін, екстрагований у супернатант, досліджувався флюориметрично, як зазначено вище.

Біомаса: оцінюється фільтруванням міцелію з бульйону за допомогою фільтрувального паперу Whatman 1, а потім промиванням і сушкою міцелію при 80°C протягом 24 год.

Продуктування позаклітинного рибофлавіну була помітна з другого дня у мутантному UV-18-57 і була майже в 8 разів вищою (825 мкг / мл), ніж батьківський штам DT1 (108 мкг / мл). UV-85 був нефлавіногенним (10-15 мкг / мл). Внутрішньоклітинний рибофлавін у UV-18-57 також був значно більшим (490 мкг / мл), ніж у DT1 (24 мкг / мл) [60].

Крім того, проводилися дослідження зі збільшення виробництва рибофлавіну з рослинної олії за допомогою мутантного штаму *Ashbya gossypii*. Цей мутант генерували шляхом обробки штаму дикого типу N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином (MNNG). Продуктування рибофлавіну виявилось у 10 разів більшим у мутанта, порівняно зі штамом дикого типу. Питома внутрішньоклітинна активність каталази у 3-х добової культури була в 6 разів вища у мутанта, ніж у штаму дикого типу. Для мутанта продуктування рибофлавіну в присутності 40 мм перекису водню було на 16% менше, ніж при відсутності перекису водню, тоді як для штаму дикого типу на 56% менше. Активність ізоцитрат-ліази в мутанта (ICL) становила 0,26 МО / мг білка під час фази активного синтезу рибофлавіну, що в 2,6 рази вище, ніж у штаму дикого типу. Ці дані вказують на те, що мутантний штам здійснює перенаправлення потоку вуглецю від циклу трикарбонових кислот до гліюксилатного циклу більш ефективно, ніж штам дикого типу, в результаті чого посилюється синтез рибофлавіну [61].

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

3.2.3 Використання метаболічної інженерії

Було проаналізовано значення всіх генів RIB у виробництві рибофлавіну у *A. gossypii*. Були виявлені два важливих етапи обмеження швидкості метаболізму, що пригнічують надсинтез рибофлавіну: по-перше, низькі рівні мРНК генів RIB перешкоджали надсинтезу рибофлавіну; по-друге, конкуренція гілки AMP (antimicrobial peptides) за пуриногенні попередники також обмежує надсинтез рибофлавіну. Таким чином, надлишкова експресія генів RIB приводила до значного збільшення виходу рибофлавіну. Більш того, як інактивація, так і недостатня експресія гена ADE12, який контролює першу стадію гілки AMP, також надали позитивний вплив на продукцію рибофлавіну. Відповідно, був сконструйований штам, який поєднує в собі як надекспресію генів RIB, так і недостатню експресію гена ADE12. Цей штам продукував 523 мг / л рибофлавіну (в 5,4 рази вище, ніж у дикого типу), що є найвищим титром рибофлавіну, отриманого метаболічної інженерією у *A. gossypii* до теперішнього часу.

Отже, продукція рибофлавіну у *A. gossypii* обмежена низькою транскрипційною активністю генів RIB. Обмеження потоку в бік AMP забезпечує виділення субстрату GTP для надсинтезу рибофлавіну без шкідливого впливу на утворення біомаси. Було отримано багатоцільовий штам *A. gossypii*, який продукує до 523 мг / л рибофлавіну [54].

3.2.4 Використання методів генної та клітинної інженерії

Два гена шляху біосинтезу рибофлавіну (RIB) у *E. ashbyi* RIB1 і RIB3, які кодують GTP-ціклогідролазу II (GCH II) і 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат (DHBP) синтазу відповідно, були обрані для даного дослідження. Два гена RIB під їх нативними промоторами були отримані з геномної бібліотеки *Ashbya gossypii*. Гени посиленого дріжджами зеленого флуоресцентного білка (yEGFP) і mCherry були помічені на С-термінальних кінцях генів RIB1 і RIB3

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

для аналізу функціональності трансгенів RIB в *E. ashbyi*. (рис. 3.5) Човникові вектори з генами RIB, міченими репортером, містили ген *Escherichia coli* kanR і елемент ARS *Saccharomyces cerevisiae*. При трансформації цими плазмідами елемент ARS виявився функціональним у *E. ashbyi*. Фактори транскрипції *E. ashbyi* можуть розпізнавати промотори гена *Ashbya gossypii* RIB і експресувати мічені репортером гени RIB як цитоплазматичні білки при ранньому розвитку клітин. Сумісність генів *A. gossypii* RIB і елемента ARS *S. cerevisiae* у *E. ashbyi* також підтверджує, що *A. gossypii*, *S. cerevisiae* і *E. ashbyi* тісно пов'язані. Реплікативні трансформанти, що несуть плазмиди RIB1-mCherry, показали в 2,95 рази більше активності GCH II і в 2,44 рази більшу продукцію рибофлавіну в порівнянні з нетрансформованими штамми.

Це перше дослідження з генетичної трансформації *E. ashbyi* і тому відіграє важливе значення як перший крок до генної інженерії цього роду.

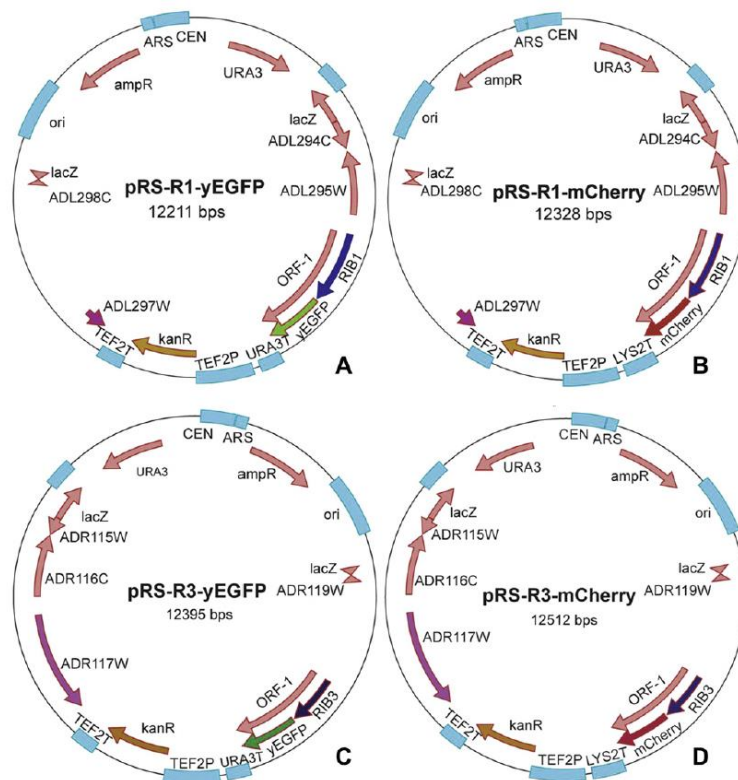


Рис. 3.5 Карти рестрикції плазмід, що несуть мічені на С-кінці гени RIB1 і RIB3 в геномних клонах *A. gossypii* для реплікативної трансформації *E. ashbyi* [40]

(A) pRS-R1-yEGFP (RIB1, мічений yEGFP), (B) pRS-R1-mCherry (RIB1, позначений на mCherry), (C) pRS-R3-yEGFP (RIB3, позначений на yEGFP) і (D) pRS-R3-mCherry (RIB3, позначений на mCherry). Два човникових вектора RIB несуть початок реплікації pUC, ген стійкості до канаміцину *E. coli* kanR під TEF-промотором і термінатор *S. cerevisiae* для відбору грибів, ген ampR, що забезпечує стійкість до ампіциліну, гістон H4 ARS і CEN6 [40].

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі



В технології використовується суперпродуцент рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 ВКПМ F-340, отриманий з Всеросійської колекції промислових мікроорганізмів [62].

Культуру *E. ashbyi* F-340 можна зберігати протягом 3 місяців на агаризованому середовищі ГПД в пробірках при 5°C у холодильнику. Якщо музейну культуру необхідно зберігати більше 7 місяців (тривалий час), то вона повинна знаходитись при кімнатній температурі [4].

Відновлення музейної культури здійснюють шляхом її пересіву у колби з рідким ГПД та культивування протягом 7 діб при 28°C на роторному шейкері при перемішуванні 180 об/хв. На даному етапі також здійснюють опромінення культури УФ-променями. Далі культуру висівають на чашки Петрі з середовищем ГПД для отримання одиничних колоній. Для перенесення у колби з рідким середовищем на основі ГФС-10 відбирають колонії, які мають інтенсивне яскраво-жовте забарвлення та інтенсивно забарвлюють поживне середовище.

Отриману музейну культуру пересівають в дві колби з рідким середовищем на основі ГФС-10 і культивують 72 години при 28°C на качалці зі 180 об/хв.

Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі триває 72 год при постійній аерації і перемішуванні з підтриманням температури 28-30°C.

Виробничу культуру отримують культивуванням протягом 120-125 год глибинним способом в ферментері при температурі 28-30°C, при безперервному перемішуванні та аерації.

Після перенаправлення у збірник, рН культуральної рідини необхідно довести розчином HCl до 4,5-5,0, оскільки за такого значення рН рибофлавін є стабільним [4].

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцевий продукт є добавкою для харчової промисловості E101 – рибофлавін, що отримується мікробіологічним синтезом з гриба *Eremothecium ashbyi*. Використовується в якості барвника жовтого кольору та для збагачення продуктів харчування вітаміном B₂. Ще одним його різновидом є натрієва сіль рибофлавін-5-фосфат (раніше мала індекс E106).

За реєстраційним номером хімічних сполук рибофлавіну надано CAS №83-88-5 та за Номером Європейського Співтовариства – EINECS No.: 201-507-1.

Так як кінцевий продукт призначений для харчової промисловості, його використовують для збагачення даним вітаміном їжі, спеціалізованих продуктів і напоїв. Також застосовують для збагачення борошна, рису, макаронів, сухих супів і напоїв, сніданків зі злаків, гірчиці, морозива, і дієтичних і різних сухих харчових продуктів. Для твердих препаратів, для збагачення комбікормів і, в разі гострого дефіциту, додавання в питну воду. Підходить для виготовлення продуктів харчування в порошкоподібній формі, для кондитерських виробів. Виробництво мультивітамінних таблеток, таблеток, желатинових капсул, рідких і сухих харчових продуктів, в тому числі спортивних продуктів харчування. Також може слугувати активним компонентом в складі косметичної продукції.

За зовнішнім виглядом E101 є кристалічним порошком від жовтого до жовто-оранжевого кольору зі слабким типовим запахом та гірким смаком. Температура плавлення досягається при 282°C. Рибофлавін погано розчинний у воді та етанолі, нерозчинний в органічних розчинниках. Має

					ДП 6204. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		
Розробив	Гнатюк М.О.						
Консульт.							
Керівник	Поліщук В.Ю.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	53	116
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

гарну термостійкість (до 150°C) та стійкість до кислот, в тому числі фруктовим. Проте лугостійкість є незначною, а світлостійкість – погана.

Форма випуску і упаковка складається з внутрішньої і зовнішньої упаковки. Внутрішня упаковка являє собою поліетиленовий або фольгований мішок або металеву/алюмінієву ємність. Зовнішня упаковка - металева або пластикова ємність, картонний або пластиковий барабан або пластиковий контейнер з тестовими кільцем або картонна коробка. Маса порошку рибофлавіну в скляному флаконі – 100 г. Упаковка у мішки реалізується у випадку великих обсягів виробництва.

Умови зберігання: в сухому, прохолодному, добре провітрюваному місці, захищеному від прямих сонячних променів і вологи. Зберігати упаковку щільно закритою. Термін придатності становить не менше 5 років з дати виробництва. Після закінчення 5 років придатність до використання сировини підтверджується результатами аналізу ретестування. Термін придатності зазначається на етикетці [34, 35].

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

В роботі [4] показано, що технологічно та економічно вигідним джерелом карбону для культивування гриба *Ermothecium ashbyi* є використання ГФС-10, що є доступним стабільним продуктом з необхідним вуглеводним складом та виробляється в Україні. В результаті стає можливим підвищити вихід рибофлавіну в 7 разів, на відміну від середовища з глюкозою, та у 3,8 рази – у разі використання середовища з фруктозою. Крім того, в якості джерел нітрогену запропоновано одночасне використання дріжджового екстракту та пептону, що містять велику кількість вітамінів та факторів росту, необхідних для підвищення синтезу рибофлавіну. Встановлено, що максимальне накопичення рибофлавіну спостерігається при концентрації ГФС-10 40 г/дм³, дріжджового екстракту 10 г/дм³ та пептону

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		54

1 г/дм³.

Згідно з даними, отриманими в роботі [18] додавання фосфатів у вигляді K₂HPO₄ дозволяє збільшити вихід вітаміну B₂ в культуральній рідині, а в роботі [63] встановлено, що найбільше накопичення вітаміну відбувається при концентрації даної фосфоровмісної солі 3 г/дм³. Проте, максимальний приріст біомаси спостерігається при концентрації K₂HPO₄ 5 г/дм³.

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів наведена в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1 Характеристика сировини та матеріалів

Найменування	Категорія та номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1 Вода питна	ДСТУ 7525:2014	Усі показники згідно НТД	Для приготування поживного середовища (ПС)
1.2. ГФС-10	ТУ У 15.6-32616426-009:2005	Усі показники згідно НТД	Компонент ПС
1.3 Дріжджовий екстракт	ТУ 9385-007-39484474-2003	Усі показники згідно НТД	Компонент ПС
1.4 Пептон	ГОСТ 13805-76	Усі показники згідно НТД	Компонент ПС
1.5 Калій фосфорнокислий однозаміщений (KH ₂ PO ₄)	ГОСТ 4198-75	Усі показники згідно НТД	Компонент ПС

2. Допоміжна сировина			
2.1 Пероксид водню (H_2O_2)	ГОСТ-177	Масова частка перекису водню – 3%	Розчин для миття підлоги та поверхонь обладнання
2.2 Засоби мийні синтетичні порошкоподібні	ДСТУ 2972:2010	Масова частка миючого засобу – 0,5%	Розчин для миття підлоги та поверхонь обладнання
2.3 Спирт етиловий (C_2H_5OH)	ГОСТ 5962-97	Масова частка спирту, 70% Масова частка спирту, 96%	Розчин для обробки столів Для промивки кристалів рибофлавіну
2.4 Натр їдкий технічний (NaOH)	ГОСТ 2263-79	Масова частка гідроксиду натрію не менше 46%	Для регулювання pH
2.5 Кислота соляна (HCl)	ГОСТ 14267-77	Усі показники згідно НТД	Для регулювання pH
2.6 Соева олія	ДСТУ 4557:2006	Усі показники згідно НТД	Для піногасіння
2.7 Гідросульфит натрію технічний $NaHSO_3$	ГОСТ 246-76	Усі показники згідно НТД	Для виділення осаду рибофлавіну
2.8 Вода технічна	ГОСТ 17.1.1.04-80	Усі показники згідно НТД	Холодоагент, теплоагент
3. Матеріали			
3.1 Флакони скляні	ТУ 9461 023-00480678-99	Основні розміри, цілісність	Внутрішня упаковка для пакування цільового

			продукту
3.2 Гумові пробки	ТУ 38 1051835-88	Основні розміри, цілісність	Для пакування цільового продукту
3.3 Картонні коробки	ГОСТ 12301-2006	Основні розміри, цілісність	Вторинна упаковка для пакування цільового продукту
3.4 Папір етикеточний	ГОСТ 7625-86	Усі показники згідно НТД	Для маркування продукції
3.5 Стрічка клеєва на паперовій основі	ГОСТ 18251-87	Усі показники згідно НТД	Для вторинної упаковки
4. Напівпродукти			
4.1 Посівний матеріал	Згідно з виробничим регламентом	Мікробіологічна чистота	Для засіву посівного апарату

4.3 Опис технологічного процесу

ДР 1 САНІТАРНА ПІДГОТОВКА ВИРОБНИЦТВА

ДР 1.1 Підготовка персоналу

Персонал, який працює на біотехнологічному виробництві у відповідності з встановленою програмою проходить навчання для кваліфікованого виконання своїх обов'язків та заходів з охорони праці. Інструктаж проводиться 1 раз на рік. Під час навчання детально обговорюється концепція забезпечення якості продукції, підготовка та проведення технологічного процесу.

До виробництва допускаються особи, які досягли 18 років, пройшли

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		57

інструктаж з техніки безпеки. Також при влаштуванні на роботу та щорічно персонал повинен пройти медичний огляд згідно з наказом Міністерства охорони здоров'я України №45 (з0136-94) від 31.03.94 року «Про затвердження Положення про порядок проведення медичних оглядів працівників певних категорій», пройти систематичне навчання щодо санітарно-гігієнічних вимог, а також дотримуватися правил особистої гігієни.

Працівники в процесі виробництва використовують спецодяг, засоби індивідуального захисту (халати, захисні окуляри, гумові рукавички, респіратори). Заміна одягу проводиться щоденно і у міру забруднення. Без спецодягу, а також в забрудненому чи неконденційному спецодязі працівники до роботи не допускаються. Забороняється у виробничі приміщення вносити верхній одяг, а також продукти харчування та інші сторонні предмети. Працівники перед початком роботи повинні одягти чистий санітарний одяг, підібрати волосся, ретельно вимити руки милом і продезінфікувати їх. Кожен працівник на підприємстві несе відповідальність за виконання правил особистої гігієни, за стан робочого місця, за виконання технологічних і санітарних вимог на своїй ділянці.

ДР 1.2 Приготування дезінфікуючих розчинів

Всі мийні, дезінфікуючі розчини і суміші готує блок стерилізації, або співробітник, призначений начальником цеху, ділянки, підрозділу за наказом.

Приготування дезінфікуючих розчинів здійснюють дотримуючись правил техніки безпеки. Дезінфікуючі розчини після приготування повинні зберігатися обмежений час у спеціальних попередньо вимитих ємностях, у яких передбачені прилади для відбору проб. Забороняється доливати свіжоприготовлений розчин в частково порожні ємності.

В реактори через вимірювач об'єму (дозатор), який встановлено на трубопроводі, надходить потрібна кількість дезінфекційного або миючого розчину (каустична сода, пероксид водню, дексоцид) та змішується з водою, яка дозується через датчик об'єму. Після 10хв перемішування отримуємо розчини для миття і дезінфекції обладнання та комунікацій.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		58

ДР 1.2.1 Приготування розчину миючого засобу

Для приготування 0,5% розчину миючого засобу для ручного миття технологічного устаткування та інвентарю через дозатор у реактор Р-2 наливають 5 мл миючого засобу та доливають 995 мл води питної температурою $(40 \pm 5)^\circ\text{C}$, старанно перемішують.

ДР 1.2.2. Приготування розчину перекису водню

Для обробки приміщень використовують розчини перекису водню. Розчин перекису водню з концентрацією 1 – 6 %, що мають бактерицидні властивості, не токсичні для людей. Вони не мають неприємного запаху, не піддають корозії метали, не псують оброблюванні предмети. Бактерицидна активність робочих розчинів підвищується з підвищенням їхньої температури.

Робочі розчини перекису водню готують в скляному посуді шляхом розведення перекису водню водою питною. Використовують 30% розчин перекису водню. Для приготування розчину заданої концентрації в реактор Р-5 подають воду питну і через дозатор додають необхідну кількість перекису водню. Термін збереження робочого розчину 5 – 6 днів. Робочий розчин перекису водню повинен готувати майстер зміни або під його спостереженням виділений для цього робочий.

ДР 1.2.3. Приготування розчину етилового спирту

Розчин етилового спирту готують в реакторі Р-8, розводячи 96% спирт питною водою. Для приготування 1 л розчину етилового спирту з об'ємною часткою спирту 76% потрібно відміряти через дозатор 792 мл 96% спирту та 208 мл питної води, перемішати. Цей розчин можна зберігати в герметично закритій скляній посудині протягом 1 місяця.

ДР 1.3 Підготовка приміщень

Підготовка виробничих приміщень включає комплекс заходів, що складаються з вологого прибирання і дезінфекції поверхонь приміщень і обладнання. Прибирання приміщень проводиться після закінчення технологічного процесу або наприкінці зміни вологим способом з

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		59

використанням дезрозчинів.

Для унеможливлення контамінації процесу біосинтезу у приміщеннях необхідно проводити щоденне та генеральне (раз на тиждень) прибирання. При щоденному прибиранні виробничих приміщень (миття підлоги та поверхонь обладнання) обробку проводять розчином перекису водню (масова частка 3%) з 0,5% миючого засобу. Якщо протягом місяця при систематичному використанні вказаного розчину стан повітря приміщення відповідає класу чистоти, то масову частку перекису водню зменшують до 1%. При виявленні у повітрі приміщення грибів або спор масову частку перекису водню в робочому розчині слід збільшити до 6%.

Кожен тиждень проводять генеральне прибирання виробничих приміщень з використанням дезінфікуючих і миючих засобів.

Підготовка приміщень мікробіологічної лабораторії

Для зниження обнасіненості повітря та поверхонь обладнання кожену зміну проводять вологе прибирання приміщень з застосуванням миючих засобів. Кожну зміну проводять обробку поверхонь (столів, підлоги, обладнання) з застосуванням перекису водню з масовою часткою 3%. Знезараження приміщень мікробіологічної лабораторії проводять бактерицидними лампами щодня упродовж 2-3 год. Перед початком та після закінчення роботи столи обробляють етиловим спиртом.

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Миття та дезінфекція обладнання

На підприємстві, після закінчення чергового технологічного циклу, здійснюють миття обладнання. Для цього в усьому обладнанні яке працює під тиском чи вакуумом доводять тиск до 0, відкривають кришки та люки апаратів і ретельно промивають їх розчином миючого засобу та водою водопровідною.

Частини обладнання, що безпосередньо торкаються поживного середовища та культуральної рідини, необхідно мити в розчині миючого засобу разом з дезінфікуючими розчинами (етиловий спирт, H_2O_2), при

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		60

температурі 50-60°C. Дезінфікуючі розчини періодично чергують, для попередження появи стійких форм мікроорганізмів.

З'ємні частини обладнання, які взаємодіють з препаратом, знімають, розбирають, ретельно миють в розчині миючого засобу з дезінфікуючими засобами (етиловий спирт, H_2O_2), при температурі 50-60°C.

ДР 1.4.2. Обполіскування обладнання та комунікацій

Після миття внутрішні поверхні обладнання та комунікації ополіскують кілька разів водою питною з обов'язковим контролем якості відмивки. З'ємні частини обладнання після дезінфекції теж ополіскують кілька разів водою питною.

Зовнішні поверхні обладнання обробляють як і виробничі приміщення.

ДР 1.4.3. Перевірка обладнання на герметичність

Перевірку обладнання на герметичність проводять після проведення всіх ремонтних та перевірочних робіт. Ємкісне обладнання на герметичність перевіряють при повітряному тиску 0,05-0,06 МПа. Якщо упродовж 30 хв тиск (по манометру) не знижується більш ніж на 0,005 МПа обладнання вважають герметичним. Фланцеві з'єднання та зварні шви головного фільтру, посівного апарату, ферментеру перевіряють на герметичність за допомогою мильної води при повітряному тиску від 0,05 до 0,06 МПа.

Обов'язково раз на тиждень на герметичність перевіряють посівну лінію з усуненням усіх можливих пропусків. Під паровим тиском перевіряють всі матеріальні, посівні і конденсатні вентиля та трубопроводи. Після перевірки герметичності обладнання, утворюється конденсат, який відправляється на знешкодження відходів.

ДР 1.5. Стерилізація обладнання та комунікацій

ДР 1.5.1. Стерилізація головного фільтра та комунікацій.

Головний фільтр стерилізують гострою парою, яка подається під тиском 0,18-0,20 МПа, при температурі $130 \pm 2^\circ C$ упродовж 2 год. Після стерилізації знижують тиск до 0,04 МПа та продувають фільтр повітрям до повного видалення вологи. Повітря після головного фільтра контролюють на

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

стерильність.

ДР 1.5.2. Стерилізація індивідуального фільтру та комунікацій

Стерилізацію індивідуального фільтру, приєднаних до фільтру арматури та трубопроводів здійснюють разом, за допомогою гострої пари, при температурі 126-132°C упродовж години. Стерилізацію індивідуальних фільтрів проводять перед кожною ферментацією. Повітря після індивідуального фільтру контролюють на стерильність.

ДР 1.5.3. Стерилізація посівного апарату та виробничого ферментеру

Після перевірки інокулятора, ферментера, комунікацій на герметичність стерилізацію проводять гострою парою під тиском 0,18-0,20 МПа при температурі 125-130°C упродовж години. В апарати подається пара на всі вузли та через всі вентилі пов'язані з стерильною зоною. Початком стерилізації вважають момент досягнення температури 125-130 °C та тиску 0,2 МПа.

ДР 2 ПІДГОТОВКА СТЕРИЛЬНОГО ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПОВІТРЯ

Повітря, яке використовується для аерації середовища у процесі отримання посівного матеріалу в інокуляторі та у процесі виробничого культивування в ферментері, повинно бути стерильним та мати температуру 28- 30°C.

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір зовнішнього повітря здійснюється через повітрозбірник ПЗ-13, який розташований на 2 м вище даху будинку.

ДР 2.2 Попередня очистка повітря

Механічні частки розміром більше 5 мкм з повітря вилучають за допомогою фільтра періодичної дії сухого типу Ф-14, у якому в якості фільтруючого матеріалу використовують пінополіуретан. Цей фільтр запобігає забрудненню вентилятора та знижує кількість контамінантів. Крім того, він вільний від недоліків масляних фільтрів – запах, втрата масла.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

Ефективність очистки складає не менш ніж 70%.

ДР 2.3. Транспортування повітря

Транспортування повітря здійснюється за допомогою поршневого компресора простої дії К-15 за тиску 0,2 МПа. Такий тиск потрібний для подолання гідродинамічного опору в системі транспортування повітря та стовпа культуральної рідини у ферментері. Стиснення повітря відбувається при зміні об'єму циліндра за рахунок зворотно - поступальної ходи поршня. При стисканні повітря у компресорі його температура підвищується з 15-25 °С на вході до 90-100 °С на виході.

ДР 2.4. Стабілізація термодинамічних показників

При виході з компресора нагріте повітря має значну вологість, а це неприпустимо для процесу фільтрування газу, так як конденсат буде формувати канали, через які можливий «проскок» неочищеного повітря. Отже, на виході з компресора встановлено теплообмінник трубчастого типу ТО-16, куди повітря поступає для охолодження до 30°C. В якості холодоносія використовується технічна вода. Далі повітря потрапляє до ресивера РС-17 для згладжування пульсацій у тиску при роботі компресійного обладнання та видалення крапельної вологи, що утворилася під час охолодження, при багатократній зміні напрямку руху повітря під час контакту з насадкою ресивера. Конденсат відводиться у каналізацію. Повітря з ресивера виходить під тиском 0,3 МПа.

ДР 2.5. Очистка повітря у головному фільтрі

Очищення повітря від пилу та мікроорганізмів менше 5 мкм здійснюється в головному фільтрі Ф-18. Використовують глибинні набивні фільтри періодичної дії. Заміна фільтруючого матеріалу проводиться 2 рази на рік. Як правило в якості фільтруючого матеріалу використовують скловолокно з діаметром 7 – 21мкм. Ефективність очистки 90 – 99%.

ДР 2.6 Стерилізація повітря в індивідуальному фільтрі

Заключна стадія стерилізації повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальних фільтрах Ф-31 та Ф-33, розташованих безпосередньо перед

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

інокулятором та ферментером. Очищення повітря від мікроорганізмів проводиться в фільтрах тонкої очистки, а саме в патронних фільтрах з тканиною Петрянова. Тканина Петрянова представляє собою надтонкі, хаотично сплетені в виді полотен на марлевій або іншій поруватій основі волокна товщиною 1,5 і 2,5 мкм з ацетатцелюлози (ФПА-15). Коефіцієнт проскоку в цих фільтруючих матеріалах складає не більш 0,1 – 0,01%.

ДР 3. ПРИГОТУВАННЯ ТА СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПІНОГАСНИКА

В якості піногасника використовується соєва олія, яка стерилізується в реакторі Р-11 за температури 120 – 122 °С та тиску 0,12 МПа протягом 2 годин.

ДР 4. ПІДГОТОВКА СТЕРИЛЬНОГО ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА

ДР 4.1 Приготування розчинів для титрування

Для доведення рН розчинів поживних середовищ до необхідного значення готують 6 %-ий розчин NaOH. У реактор Р-21 вносять 3 кг сухого гідроксиду натрію і доводять питною водою до загального об'єму 50 л.

Для доведення рН розчинів поживних середовищ до необхідного значення та культуральної рідини після ферментації до 4,5-5,0 готують 6 %-ий розчин HCl. У реактор Р-24 вносять 3 л соляної кислоти концентрованої і доводять питною водою до загального об'єму 50 л.

Проводять стерилізацію розчинів для титрування за температури 120 – 122 °С та тиску 0,12 МПа протягом 2 годин.

ДР 4.2. Змішування і стерилізація середовища для виробничого біосинтезу

При вирощуванні *E. ashbyi* F-340 у виробничому ферментері Вф-30 використовують модифіковане поживне середовище на основі ГФС-10 наведеного нижче складу.

Поживне середовище для культивування готують у реакторі Р-27, загальний об'єм якого – 1 м³. У стерильний апарат заливають 0,41 м³ питної води (з врахуванням 10% утворюваного конденсату і внесення добавок, об'єм

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		64

поживного середовища збільшується до 0,5 м³) і вносять складові в такій кількості:

ГФС-10 – 20 кг;

дріжджовий екстракт – 5 кг;

пептон – 0,5 кг;

K₂HPO₄ – 1,5 кг.

Стерилізують у цьому ж реакторі при температурі 120°C протягом години. Стерильним розчином NaOH доводять рН отриманого середовища до 7,5, що є оптимальним для культивування штаму-продуцента *E. ashbyi* F-340 з метою максимального накопичення рибофлавіну.

ДР 4.3. Охолодження середовища для виробничого біосинтезу

Простерилізоване поживне середовище охолоджують шляхом подачі води технічної холодної в сорочку реактора до температури 30°C да доводять рН розчинами для титрування до 7,5.

ДР 5 ПІДГОТОВКА ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ

Якщо зберігання культури виробничого штаму *E. ashbyi* F-340 заплановано протягом 3 місяців, то його можна проводити на агаризованому середовищі ГПД в пробірках у холодильнику при температурі 5°C. В разі тривалого зберігання (більше 7 місяців), музейна культура має знаходитись при кімнатній температурі.

ДР 5.1 Відновлення музейної культури

Перед тим як почати роботу з посівним матеріалом необхідно здійснити перевірку культуру на рівень накопичення рибофлавіну. В разі недостатніх значень вітаміну здійснюють підтримуючу селекцію шляхом пересіву штаму з музейної культури у колби на 250 см³ з 50 см³ рідкого середовища ГПД та культивування протягом 7 діб при 28°C на роторному шейкері при перемішуванні 180 об/хв перед запуском чергового виробничого циклу.

Далі культуру висівають на чашки Петрі з середовищем ГПД для

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

отримання одиничних колоній. Для перенесення у колби з рідким середовищем на основі ГФС-10 (використовується у посівному апараті) відбирають колонії, які мають інтенсивне яскраво-жовте забарвлення та інтенсивно забарвлюють поживне середовище. Умови культивування наведені вище. Вміст рибофлавіну в культуральній рідині має становити не менше 200 мг/дм³. У випадку, якщо накопичення рибофлавіну значно зменшується, необхідно провести опромінення культури УФ-променями протягом 1 хвилини.

Всі роботи з музейною культурою проводяться в строго асептичних умовах відповідальною особою.

ДР 5.2 Отримання посівного матеріалу в колбах

Отриману музейну культуру пересівають в дві колби Кб-32 на 250 см³ з 50 см³ рідкого середовища на основі ГФС-10 (використовується у посівному апараті) і культивують 72 години при 28°C на качалці зі 180 об/хв.

Попередньо необхідно провести стерилізацію колб з середовищем в автоклаві 40 хвилин при надлишковому тиску 0,12 МПа. Засів 1 см³ активної музейної культури здійснюють стерильно, після охолодження вмісту колби до 28 – 30°C. Колби поміщають на качалку.

Одержаний посівний матеріал перевіряють на відсутність контамінуючої мікрофлори розсівом на МПА і подальшим мікроскопіюванням.

ДР 5.3 Отримання посівного матеріалу в інокуляторі

Вирощування посівного матеріалу проводять в лабораторному інокуляторі Ін-34 на 15 дм³ з заповненням 0,5 через значне піноутворення. Технологічний режим вирощування посівного матеріалу: при ввімкненій мішалці та барботері заливається 7,5 дм³ стерильного поживного середовища. Після чого інокулятор засівають культурою з колб у кількості 75 см³ через посівний штуцер. Перед засівом подачу повітря в інокулятор припиняють і тиск знижують повністю. Після цього закривають і вихідний вентиль. Перед внесенням культури навколо посівного штуцера створюють

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

зону полум'я за допомогою спиртівки. Потім обережно викручують пробку. Краї посівної колби обпалюють в полум'ї факела і вміст її переносять в інокулятор. Після цього в посівний апарат знову пускають повітря, відкривши повністю вхідний вентиль, і підтримують надлишковий тиск в межах 10^4 Па, регулюючи вихід повітря. Одразу після засіву (1 % посівного) проводять мікробіологічний контроль.

Вирощування посівного матеріалу здійснюється при постійній аерації і перемішуванні з підтриманням температури 28-30°C. Температурний режим підтримується за допомогою подачі в сорочку гарячої води. Витрати повітря на вирощування – 1-1,2 м³/м³·хв. Вирощування культури проводять протягом 72 годин.

Для контролю за процесом вирощування кожні 12 годин із апарату відбирають проби, які перевіряють на відсутність контамінуючої мікрофлори розсівом на МПА і мікроскопіюванням.

Після закінчення процесу інокулюм передається у виробничий ферментер Вф-30 по стерильним комунікаціям, які попередньо повинні бути простерилізовані протягом години паром з надлишковим тиском 0,1 МПа.

ТП 6 КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОДУЦЕНТА У ФЕРМЕНТЕРІ

Виробничу культуру отримують глибинним способом у виробничому ферментері Вф-30 об'ємом 1 м³, коефіцієнт заповнення 0,6. Після охолодження простерилізованого поживного середовища до температури 30°C, вноситься отриманий посівний матеріал з інокулятора у кількості 1% від кількості поживного середовища.

Виробничий біосинтез ведеться при температурі 28-30°C, при безперервному перемішуванні та аерації. Режим аерації 1,5-2 м³/м³·хв. За необхідністю в ході процесу стерильно додають піногасник - соєву олію. Протягом усього процесу ферментації через кожні 12 годин відбирають пробу культурної рідини в асептичних умовах для дослідження морфологічного стану міцелію, відсутності сторонньої мікрофлори, вмісту вуглеводів, кількості синтезованого рибофлавіну і визначення рН

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

культуральної рідини. Штуцер для відбору проб пропарюють до і після відбору проб. Інший час штуцер щільно закритий.

Тривалість біосинтезу від 120 до 125 годин.

Одержана культуральна рідина повинна відповідати наступним параметрам: вміст рибофлавіну – 3 г/л; концентрація біомаси – 4,5-6,7 г/дм³.

Культуральну рідину передають у збірник, рН доводять розчином HCl до 4,5-5,0, оскільки за такого значення рН рибофлавін є стабільним.

ТП 7 НАГРІВАННЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ

Оскільки при завершенні ферментації певна кількість рибофлавіну залишається зв'язаною з міцелієм, то необхідно провести нагрівання культуральної рідини безпосередньо у виробничому ферментері Вф-30 при 95-100°C протягом однієї години. За цих умов весь рибофлавін виходить з клітин.

ТП 8 ВІДДІЛЕННЯ ЗАЛИШКІВ БІОМАСИ

Нагріту і витриману культуральну рідину зі стадії ТП 7 подають на центрифугу Ц-37 зі швидкістю обертання 3000 об/хв. Отриманий в результаті центрифугування фугат передають на стадію виділення рибофлавіну ТП 9, а біомасу, що може бути використанна для збагачення кормів, на стадію переробки відходів.

ТП 9 ВІДНОВЛЕННЯ РИБОФЛАВІНУ

До фугату, що містить рибофлавін у розчинному стані, у реакторі Р-39 при безперервному перемішуванні без доступу повітря додають гідросульфід натрію (який є відновником) у співвідношенні 1:1 по відношенню до рибофлавіну. При цьому випадає осад зеленого кольору, що властивий лейкофлавіну.

ТП 10 ВИДІЛЕННЯ ОСАДУ РИБОФЛАВІНУ

Осад відділяють центрифугуванням на центрифугі Ц-42 при 10-15°C. Фугат зливають в каналізацію. Осад передають на стадію перекристалізації ТП 11.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		68

ТП 11 РОЗЧИНЕННЯ ОСАДУ В НСІ

В реактор Р-43 подають осад зі стадії ТП 9, НСІ та питну воду в такій кількості, щоб масова частка соляної кислоти була близько 3,3%. Масу витримують в реакторі при температурі 98-99°C від одної до трьох годин та піддають наступному охолодженню.

ТП 12 ОХОЛОДЖЕННЯ РОЗЧИНУ РИБОФЛАВІНУ

Для кристалізації розчин з попередньої стадії необхідно охолодити до температури від мінус двох до нуля градусів. Охолодження проводять протягом 8 год в тому ж реакторі шляхом подачі води технічної холодної в сорочку реактора. Далі проводять виділення кристалів рибофлавіну.

ТП 13 ВИДІЛЕННЯ КРИСТАЛІВ РИБОФЛАВІНУ

Масу зі стадії ТП 12 фугують на центрифугі Ц-46 зі швидкістю обертання 3000 об/хв. Фугат зливають в каналізацію. Осад кристалів рибофлавіну передають на стадію промивки.

ТП 14 ПРОМИВКА КРИСТАЛІВ СПИРТОМ

Виділені кристали рибофлавіну промивають холодним спиртом в збірнику 36-47 для видалення можливих залишків реагентів. Отримані промиті кристали рибофлавіну передають на стадію сушіння.

ТП 15 СУШІННЯ РИБОФЛАВІНУ В БАРАБАННІЙ ВАКУУМ-СУШАРЦІ

Осад рибофлавіну висушують на барабанній вакуум сушарці СШ-48 типу RTSD 125.

Дані сушарки використовують для сушіння різноманітних продуктів мікробного синтезу. Барабанна вакуум-сушарка складається з циліндричного вакуумного корпусу з сорочкою обігріву, який обертається навколо горизонтальної осі і штуцера з кишкою і люком, що при малих розмірах барабану служить для завантаження і вивантаження матеріалу. Перемішування в обертовому барабані дозволяє забезпечити рівномірний підведення тепла в процесі, що істотно впливає на якість і тривалість процесу сушіння. Температура сушіння – 140°C.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

Порошок рибофлавіну подається на пакування.

ПМВ 16 ПАКУВАННЯ, МАРКУВАННЯ, ВІДВАНТАЖЕННЯ ПРОДУКТУ

Рибофлавін фасується на пакувальній машині Пм-49 у скляні флакони по 100 г, що являють собою внутрішню упаковку. Зовнішня упаковка представлена картонною коробкою.

Маркування виконується державною мовою і мовою, що обумовлена в контракті на поставку. На кожен пакувальну одиницю наносять маркування або наклеюють етикетку, що містить наступні дані: назва підприємства-виробника, його адреса, товарний знак, номер партії, маса нетто, дата виготовлення, строк придатності до використання.

ПВ 17. ПЕРЕРобКА ВІДХОДІВ

У даному виробництві використовуються матеріали та речовини, що можуть повторно використовуватися при належній їх обробці. Це фільтрувальні матеріали та біомаса *E.ashbyi*.

Відновлення фільтрувальних матеріалів, що використовуються при підготовці води та повітря, відбувається за рахунок вимочування їх в гарячій воді з подальшим чищенням та обробкою дезінфікуючими розчинами.

На етапі відділення залишків біомаси, відділена центрифугуванням біомаса після переробки може використовуватися у тваринництві для збагачення кормів.

ЗВ 18. ЗНЕШКОДЖЕННЯ ВІДХОДІВ

Останньою стадією технологічного процесу є регенерація і знешкодження відходів, а саме некондиційного посівного матеріалу та промивних вод і вентиляційного та технологічного повітря при їх викидах в атмосферу, партій бракованого препарату, залишків пакувальних матеріалів тощо. Дана стадія забезпечує екологічну чистоту виробництва отримання цільових препаратів.

Нейтралізація та каналізування стоків

Схема очистки стічних вод включає первинну і вторинну очистку.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

Первинна включає механічне відділення забруднень (вловлювання крупних домішок), а вторинна – очистка стічних вод в системі очисних споруд.

Очистка повітряних викидів

Очистка повітря від механічних домішок здійснюється в циклонах. Очищене повітря йде в атмосферу, а твердий осад – змішується зі стоками і подається на біологічну очистку.

Знешкодження некондиційного матеріалу

Некондиційний матеріал знешкоджують шляхом термічної обробки безпосередньо в апаратах за температури 130-132°C і тиску 0,2МПа протягом 45 хвилин. Після охолодження і встановлення рН=7 матеріал зливають у каналізацію.

4.4 Матеріальний баланс

Таблиця 4.2 Матеріальний баланс виробництва

Використано					Отримано			
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість		
		кг	шт	л		кг	шт	л
Культивування продуцента у ферментері з подальшим нагріванням КР								
ТП 6, 7	Вода водопровідна			410	Культуральна рідина			480
ТП 6, 7	ГФС-10	20			Втрати 5%			25
ТП 6, 7	Дріжджовий екстракт	5						
ТП 6, 7	Пептон	0,5						
ТП 6, 7	K ₂ HPO ₄	1,5						
ТП 6, 7	Поживне середовище з врахуванням 10% утвореного конденсату і			500				

	внесення добавок							
ТП 6, 7	Посівний матеріал			5				
	Всього:	505			Всього:	505		
Відділення залишків біомаси								
ТП 8	Культуральна рідина			48 0	Фугат			453, 84
					Осад	2,16		
					Втрати 5%			24
	Всього:	480			Всього:	480		
Виділення осаду рибофлавіну								
ТП 9	Фугат			45 3,8 4	Осад рибофлавіну	2,3		
					Фугат			428, 54
					Втрати 5%			23
	Всього	453,84			Всього	453,84		
Нагрівання осаду в HCl та наступне охолодження								
ТП 10, ТП 11	Осад рибофлавіну	2,3			Розчин рибофлавіну	221		
	Розчин HCl	230			Втрати 5%:	11,3		
	Всього:	232,3			Всього:	232,3		
Виділення кристалів рибофлавіну та їх промивка								
ТП 12, 13	Розчин рибофлавіну	221			Осад кристалів рибофлавіну	6		
					Фугат	204		
					Втрати 5%	11		
	Всього:	221			Всього:	221		
Сушіння рибофлавіну								

					ДП 6204. 00.000 ПЗ			Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				72

ТП 14	Осад кристалів рибофлавіну	6			Порошок рибофлавіну	5		
					Втрати:	1		
	Всього:	6			Всього:	6		
Пакування, маркування, відвантаження продукту								
ПМВ 15	Порошок рибофлавіну	5			Запакований препарат рибофлавіну	0,1	50	
	Флакони скянї		50					
	Всього:	56			Всього:	56		

4.5 Контроль виробництва

Для отримання якісної продукції, що відповідає усім зазначеним вимогам, здійснюється контроль виробництва. Важливі контрольні точки, методи контролю та норми наведені у таблиці 4.3

Таблиця 4.3

Контроль виробництва

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що контролюється	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.2. Приготування Дезинфікуючих розчинів Кх 1.2.1. Кт 1.2.2.	Концентрація розчинів	Мірний посуд, дозатор, візуально	Кожну операцію	$C_{\text{миюч.зас.}} = 0,5\%$ $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 3\%$ Термін прид.=5 діб $C_{\text{ет.спирт}} = 76\%$ Термін прид. = 1міс.
ДР 1.3 Підготовка приміщень Кмб 1.3.1	Кількість мікроорганізмів	Візуально, мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	КУО<200.
ДР1.4.1 Миття та дезінфекція	Температура, мікробна контамінація	Термометр, візуально	Кожну операцію	$t = 50-60^\circ\text{C}$

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		73

обладнання та комунікацій Кт 1.4.1.1 Кмб 1.4.1.2				
ДР1.4.2 Перевірка обладнання на герметичність Кт 1.4.2.1	Герметичність	манометр, мильна вода	Кожну операцію	$P=0,05-0,06$ МПа $\tau=30$ хв Норма відхилення = $0,005$ МПа
ДР1.5 Стерилізація обладнання та комунікацій Кт 1.5.1 Кмб 1.5.2	Чистота обладнання, вміст мікроорганізмів, температура, тиск	Візуально, мікробіологічний аналіз, термометр, манометр	Кожну операцію	$t=125-130$ °C $P=0,18-0,2$ МПа $\tau=1-2$ год
ДР 2 Підготовка стерильного технологічного повітря Кт 2.1 Кмб 2.2	Температура, вміст мікроорганізмів та часток	Термометр, метод визначення мікробної контамінації (проба повітря КУО/м ³), Седиментаційний (седиментація на пластинку КУО/м ³)	Кожну операцію	$t=28-30$ °C Поп. очистка: $d_{\text{часток}} < 5$ мкм, $E=70\%$ Гол. фільтр: $d_{\text{склов.}}=7-21$ мкм, $E=90-95\%$ інд. фільтр: $E=99\%$, товщина фтороп. втулок=4 мм
ДР 3 Приготування та стерилізація піногасника Кт 3.1 Кмб 3.2	Стерильність, тиск, температура, час	Термометр, манометр, годинник	Кожну операцію	$t=120-122$ °C $P=0,12$ МПа $\tau=2$ год.
ДР 4.1 Приготування розчинів для	Концентрація розчинів для титрування	Дозатор	Кожну операцію	$C_{\text{NaOH}}=6\%$ $C_{\text{HCl}}=6\%$

титрування Кт 4.1.1				
ДР 4.2 Змішування і стерилізація середовища для виробничого біосинтезу Кт 4.2.1 Кмб 4.2.2	концентрація компонентів середовища, температура, стерильність, тиск, перемішуван ня	термометр, мікробіологічний аналіз, манометр, мішалка	Кожну операцію	$t=120^{\circ}\text{C}$ $\tau=1$ год, $P=0,2$ МПа, $n=2$ с ⁻¹
ДР 4.3 Охолодження поживного середовища Кт 4.3.1 Кх 4.3.2	Температура, рН середовища	термометр, рН- метр	Кожну операцію	$t=30^{\circ}\text{C}$ $\text{pH}_{\text{сер.}}=7,5$
ДР 5.1 Відновлення музейної культури Кмб 5.1.1 Кт 5.1.2	Концентраці я рибофлавіну, контамінація чужорідною мікрофлорою , аерація, температура, час	Спектрофотометри чний метод, розсів на МПА та мікроскопіювання, ротормий шейкер, термометр, годинник	Кожну операцію	$C_{\text{рибофлавіну}}=$ 200 мг/дм ³ $t=28^{\circ}\text{C}$ $\tau=120$ год, $n=180$ об/хв
ДР 5.2 Отримання посівного матеріалу у колбах Кмб 5.2.1 Кт 5.2.2	контамінація чужорідною мікрофлорою , рН, аерація, температура, час	Розсів на МПА та мікроскопіювання, ротормий шейкер, термометр, годинник, рН-метр	Кожну операцію	$\text{pH}=6-6,5$ $t=28^{\circ}\text{C}$ $\tau=72$ год, $n=180$ об/хв
ДР 5.3 Отримання посівного матеріалу в інокуляторі Кт 5.3.1 Кмб 5.3.2	контамінація чужорідною мікрофлорою , рН, аерація, температура, час, витрати повітря	Відбір проб і розсів на МПА та мікроскопіювання, рН-метр барботер, термометр, годинник, витратомір повітря	Кожні 12 год	$\text{pH}=6-6,5$ $t=28\pm 2^{\circ}\text{C}$ $\tau=72$ год, $n=180$ об/хв $Q=1-1,2$ м ³ /м ³ ·хв
ТП 6 культивуванн я продуценту у ферментері	контамінація чужорідною мікрофлорою , рН, аерація,	Відбір проб і розсів на МПА та мікроскопіювання, рН-метр барботер,	Кожні 12 год	$\text{pH}=7,5$ $t=28\pm 2^{\circ}\text{C}$ $\tau=120$ год, $n=180$ об/хв

Кт 6.1 Кмб 6.1	температура, час, витрати повітря	термометр, годинник, витратомір повітря		$Q=1,5-2$ $\text{м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{хв}$
ТП 7 Нагрівання культурально ї рідини	Температура, час	Термометр, годинник	Кожну операцію	$t=120^\circ\text{C}$, $\tau=1$ год
ТП 8 Відділення залишків біомаси Кт 8.1	Швидкість обертання	Тахометр	Кожну операцію	$n=3000$ об/хв
ТП 9 Виділення осаду рибофлавіну Кт 9.1	Швидкість обертання, температура	Тахометр, термометр	Кожну операцію	$n=3000$ об/хв, $t=10-15^\circ\text{C}$
ТП 10 Нагрівання осаду в HCl Кт 10.1 Кх 10.2	Температура, час, масова частка HCl	Термометр, годинник, дозатор	Кожну операцію	$t=98-99^\circ\text{C}$ $\tau=1-3$ год Масов. частка HCl=3,3%
ТП 11 Охолодження розчину рибофлавіну Кт 11.1	Температура, час	Термометр, годинник	Кожну операцію	$t=-2-0^\circ\text{C}$ $\tau=8$ год
ТП 12 Виділення кристалів рибофлавіну Кт 12.1	Швидкість обертання	Тахометр	Кожну операцію	$n=3000$ об/хв
ТП 13 Промивка кристалів спиртом Кх 12.1 Кт 12.2	Температура, масова частка спирту	Термометр, дозатор	Кожну операцію	$t=5^\circ\text{C}$, Масов. частка _{етил.спир} _{ту} =96%
ТП 14 Сушка рибофлавіну Кт 14.1 Кх 14.2	Початковий вміст СР, Вологість кінцева, температура	Термометр, психрометр	Кожну операцію	$\text{СР}_{\text{поч.}}=10-12\%$ $w_{\text{кінц.}}=8\%$ $t=190^\circ\text{C}$,

ПМВ 15 Пакування, маркування, відвантаження продукту Кт 15.1	Дозування, кількість скляних флаконів у коробці, цілісність	Автоматично	Кожну операцію	В 1 флаконі 100 г порошку.
ЗВ 16 Знешкодження відходів та викидів	Концентрація відходів	Кількісний хімічний та мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до санітарних правил і норм
ПВ 17 Переробка відходів та викидів	Наявність хімічних, механічних, мікробіологічних забруднень	Кількісний хімічний та мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до санітарних правил і норм

4.6 Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва вітаміну В₂ на глюкозо-фруктозному сиропі подана на одному аркуші формату А1 у графічній частині дипломного проекту.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		77

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Перемішування – одна з найбільш поширених виробничих операцій. Перемішування має значний вплив на тепло- і масопередачу і в тій чи іншій мірі впливає на результати хімічних процесів. Квілен визначає перемішування як «контактування двох і більше різнорідних порцій речовини, що призводить до досягнення бажаного рівня як фізичної так і хімічної однорідності кінцевого продукту». Гази, що заключенні в ємність, швидко перемішуються внаслідок молекулярної дифузії. Однак в рідинах молекулярна дифузія протікає дуже повільно, тому, щоб пришвидшити перемішування всередині рідин, використовують механічну енергію мішалки, що обертається. Якщо для досягнення бажаного результату обраний невдалий тип мішалки, більша частина механічної енергії може бути витрачена даремно. При обертанні мішалки в обмеженій масі рідини в результаті існування градієнтів швидкості утворюються вихрові потоки. При контакті цих високошвидкісних потоків зі стаціонарною або рідиною, що повільно рухається, відбувається передача кінетичної енергії. Рідина з низькою швидкістю проникає в більш швидкісні потоки, призводячи до вимушеної дифузії і перемішуванню. Тому перемішування можна розглядати як вимушена дифузія в обмеженій масі рідини.

Для перемішування рідких середовищ застосовують наступні способи перемішування:

					ДП 6204. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Гнатюк М.О.				РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.	Фесенко С.В.					Д	78	116
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник	Поліщук В.Ю.							
Затвер.								

- Пневматичний (барботажний);
- Циркуляційний;
- Механічний за допомогою мішалок.

Пневматичне перемішування здійснюють за допомогою стисненого газу (у більшості випадків повітря), що пропускається через шар перемішуваної рідини. Для рівномірного розподілу газу в шарі рідини газ подається в змішувач через барботер. Барботер являє собою ряд перфорованих труб, розташованих у днища змішувача по колу або спіралі. Інтенсивність перемішування визначається кількістю газу, що пропускається в одиницю часу через одиницю вільної поверхні рідини в змішувачі. Проте пневматичне перемішування має обмежене застосування. Воно використовується тоді, коли допускається взаємодія перемішуваної рідини з газом.

Циркуляційне перемішування здійснюють за допомогою насоса, що перекачує рідину по замкнутій системі змішувач-насос -змішувач. Інтенсивність циркуляційного перемішування залежить від кратності циркуляції, тобто співвідношення подачі циркуляційного насоса в одиницю часу до об'єму рідини в апараті. У ряді випадків замість насосів можуть застосовуватися парові ежектори. Це перемішування доцільно застосовувати в тому випадку, коли є необхідність відведення тепла через розвинену поверхню теплообміну, тобто через виносний теплообмінник.

Механічне перемішування використовують засноване на безпосередньому підведенні енергії в об'єм середовища за допомогою різних перемішувальних пристроїв – мішалок, що відрізняються конструктивним виконанням і швидкохідністю. Мішалка являє собою комбінацію лопатей, насаджених на обертовий вал.

Механічне перемішування завдяки своїй порівняльній простоті, а також різноманітності типорозмірів і конструкцій мішалок є універсальним засобом для перемішування малов'язких і в'язких середовищ, тому воно широко застосовується в різних галузях промисловості.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		79

За конструктивною формою, в залежності від пристрою лопатей, мішалки поділяються на:

- лопатеві;
- листові;
- якірні;
- рамні;
- турбінні;
- пропелерні;
- спеціальні.

Всі вони (рис. 5.1) складаються з трьох основних частин: валу, на якому закріплена мішалка, мішалки, що є робочим елементом, і приводу, за допомогою якого вал приводиться в рух за рахунок механічної енергії [64].

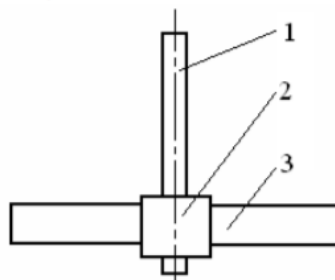


Рис. 5.1 Основні частини мішалок:

1 – вал, 2 – втулка, 3 – лопать

В процесі перемішування в залежності від в'язкості рідин можна застосовувати різні типи мішалок (рис. 5. 2) За частотою обертання робочого органу перемішуючі пристрої діляться на тихо-і швидкохідні, при цьому тихохідні перемішують в ламінарному режимі, а швидкохідні - переважно в турбулентному режимі. До тихохідних відносять лопатеві, рамні, якірні і листові, що мають швидкість понад 80-100 об/хв. До швидкохідних – турбінні та пропелерні.

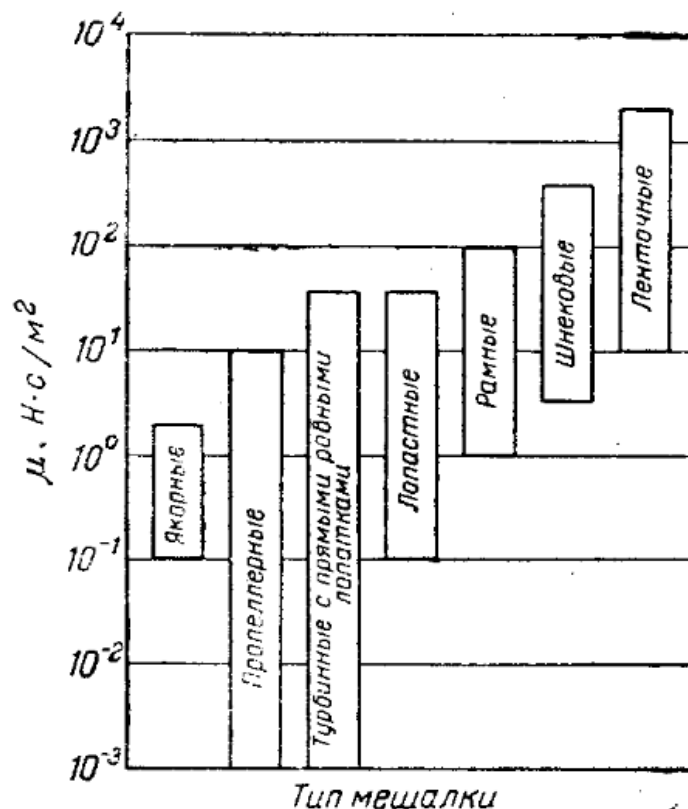


Рис. 5.2 Вибір типу мішалки в залежності від в'язкості рідини, що обробляється

Так як найбільшу частку серед компонентів середовища має ГФС-10 з в'язкістю 770-880 спз (сантипуаз) [65], що дорівнює 0,77-0,8 Н·с/м², то доцільно обрати мішалку турбінного типу з прямими рівними лопатками, призначену для перемішування рідин з низькою чи середньою в'язкістю. Це мішалки загального призначення, які можна застосовувати при різноманітних умовах процесу. Одним з найбільш поширених типів турбінних мішалок є турбінна мішалка з шістьма прямими рівними лопатками, що кріплять на диску (рис. 5.3). Рекомендовано встановлювати над дном апарату на висоті, рівній діаметру робочого колеса, рекомендований діаметр цих мішалок має бути рівним одній третій діаметру апарата [66].

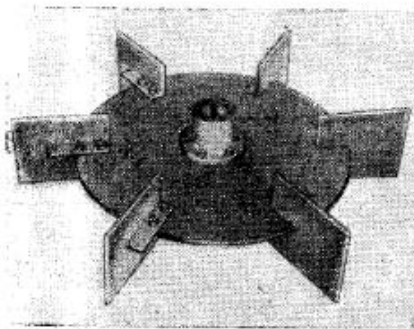


Рис. 5.3 Турбінна мішалка з шістьма з'ємними прямими рівними лопатками

Турбінні мішалки (рис. 5.4) виготовляють у формі коліс турбін з плоскими, похилими і криволінійними лопатями. Вони бувають відкритого і закритого типів. Закриті мішалки мають два диски з отворами в центрі для проходу рідини. Для одночасного створення радіального і осьового потоків застосовують турбінні мішалки з похилими лопатями. Турбінні мішалки забезпечують інтенсивне перемішування у всьому робочому обсязі змішувача. Ці мішалки працюють за принципом відцентрового насоса, тобто всмоктують рідину в середину і за рахунок відцентрової сили відкидають її до периферії. Закриті мало відрізняються по конструкції від колеса відцентрового насоса і підрозділяються, у свою чергу, на мішалки одностороннього і двостороннього всмоктування. Відкрита мішалка представляє собою диск з радіально розташованими лопатками. Вони більш прості за конструкцією і тому частіше застосовуються в техніці. В апаратах з турбінними мішалками обов'язкова установка відбивних перегородок. При відсутності такої перегородки утворюється глибока воронка, іноді доходить до основи мішалки і перемішування різко погіршується (зазвичай встановлюють чотири перегородки) [64]. Відповідно до типової технології [67] прийнято застосовувати турбінну мішалку відкритого типу.

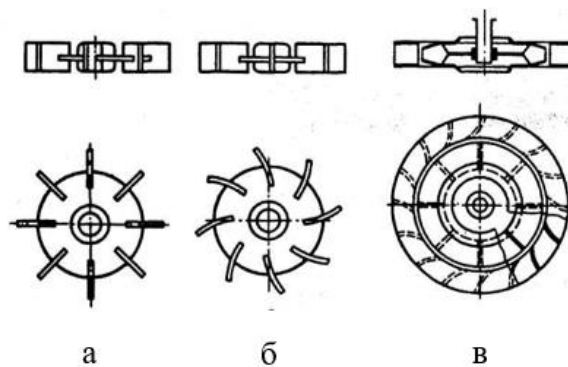


Рис. 5.4 Типи турбінних мішалок

а – відкрита турбінна, б – відкрита турбінна з похилими лопатями, в –
закрита турбінна

Реактори-змішувачі являють собою вертикальні циліндричні апарати об'ємом від 0,1 до 100 м³ і більше, забезпечені гладкою привареною пароводяною рубашкою чи рубашкою з напівтруб (рис. 5.5).

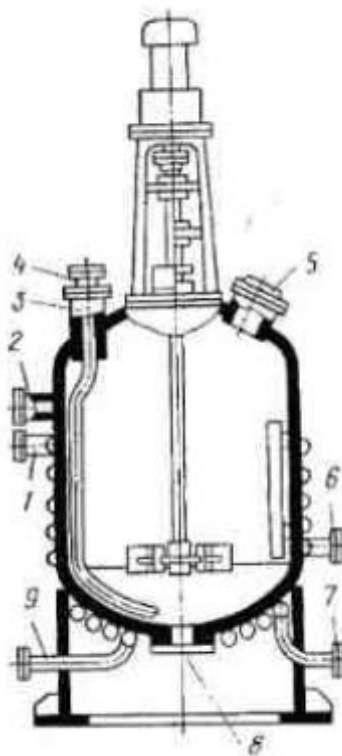


Рис. 5.5 Вертикальний реактор-змішувач:

1 – штуцер для входу теплоносія, 2 – перелив продукту, 3 – труба передавлювання, 4 – технологічний штуцер, 5 – люк, 6 – вихід теплоносія, 7 –
вхід теплоносія, 8 – вихід продукту, 9 – вихід теплоносія

Всередині апарату розміщений перемішуючий пристрій з турбінною відкритою мішалкою.

При застосуванні апаратів з рубашкою з напівтруб допускається робочий тиск до 1,6 МПа, в гладких приварених рубашках – не більше 0,4 МПа. В рубашку чи змішувач можуть подаватися водопровідна чи оборотна вода, розсіл, насичений водяний пар чи високотемпературний органічний теплоносій. Реактори-змішувачі можуть бути роз'ємними або суцільнозварними з еліптичним днищем і кришкою. На апараті розміщені штуцери для входу теплоносія, переливу продукту, для труби передавлювання, технологічний штуцер, завантажувальний люк, штуцери для входу і виходу теплоносія і продукту, запобіжний клапан, штуцери для термометру. Після подачі в апарат заданої кількості води здійснюється загрузка сипучих компонентів за допомогою гнучкого механічного транспортеру. Нагрів середовища до заданої температури відбувається автоматичними засобами управління.

Частота обертання мішалки становить $0,25-3,33\text{ с}^{-1}$ в залежності від видів перемішуючого пристрою і властивості змішуваних компонентів.

При встановленні мішали турбінного типу частота обертання $3-3,3\text{ с}^{-1}$, рамного типу – $0,33-1\text{ с}^{-1}$.

Привод мішалки здійснюється від електродвигуна нормального чи вибухозахищеного через вертикальний редуктор.

Апарати виготовляють із сальниковими потовщеннями для нетоксичних і не вибухонебезпечних середовищ, що працюють при атмосферному тиску, і з торцевими потовщеннями типу ТДМ при надлишковому тиску до 0,6 МПа чи під вакуумом до 40 кПа для токсичних, пожежонебезпечних чи вибухонебезпечних середовищ [67].

Детальний розгляд будови реактору-змішувача зображений на рис. 5.6.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		84

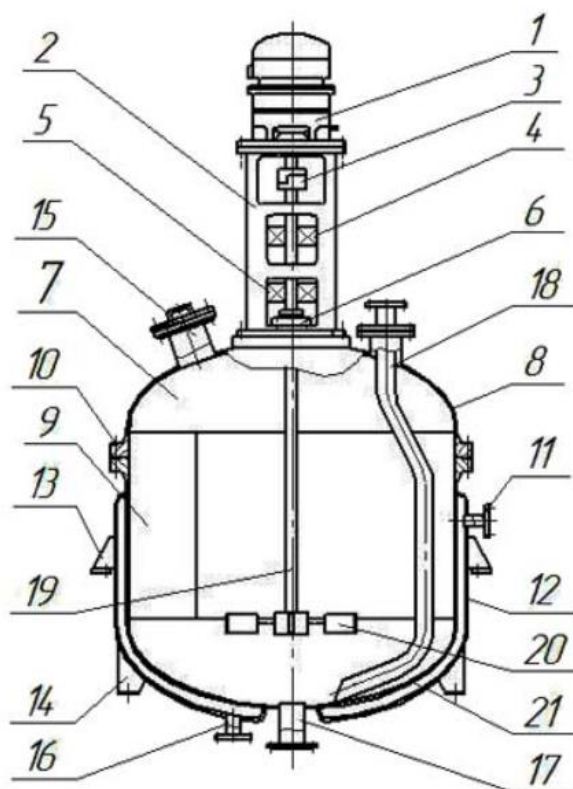


Рис. 5.6 Будова апарату з перемішуючим пристроєм:

1-мотор-редуктор, 2-стійка приводу, 3-сполучна муфта, 4-опорно-упорний підшипник, 5-радіальний підшипник, 6-ущільнюючий пристрій, 7-корпус апарату, 8-кришка корпусу апарату, 9-обичайка корпусу, 10 фланці, 11-штуцер подачі теплоносія, 12-гладка приварна сорочка, 13-опори апарату (лапи), 14-стійка, 15-люк, 16-штуцер виведення конденсату, 17-штуцер виходу продукту, 18-труба передавлювання, 19-вал мішалки, 20-мішалка, 21-днище корпусу [68]

Як привід найбільш широко застосовують агрегат мотор-редуктор (електродвигун із редуктором) з вертикальним валом. Бувають також приводи з горизонтальним і бічним розташуванням валу. Можливо верхнє і нижнє розташування вертикального приводу по відношенню до змішувача. Привід мішалки в основному установлюють на кришці, у ряді випадків - на окремих монтажних конструкціях. У зоні введення валу в корпус апарату встановлюють ущільнення.

Вал перемішування з'єднується з валом редуктора найчастіше поздовжньо-рознімною або зубчастою муфтою. У першому випадку опорою вала є підшипник редуктора.

При роботі мішалки виникає обертове коливання внаслідок динамічних навантажень на консольний кінець вала. Для усунення коливань і підвищення надійності в реакторах зазвичай встановлюють кінцевий або проміжний підшипник.

Як корпус переважно використовують посудини циліндричної форми, у деяких випадках - прямокутної форми. Корпус циліндричної посудини може мати сорочку або приварені до корпусу змійовики, у корпусі можуть встановлюватися різноманітні внутрішні пристрої - відбивальні перегородки, барботери, передавлювальні труби та інші.

Обираючи матеріали для апаратів, необхідно враховувати, що механічні властивості матеріалів можуть істотно змінюватися в залежності від температури і тиску. Як правило, властивості міцності металів і сплавів підвищуються при низьких температурах і знижуються при високих.

В нашому випадку поживне середовище перемішується при температурі 37°C і тиску 1 атм. Поживні середовища не є агресивними речовинами, тому для стійкості конструкції при виготовленні апарату може бути використана легована сталь 12X18H10T. Цей матеріал здатен забезпечити міцність і стійкість апарату, є хімічно інертним, нетоксичним, корозійностійкий, здатен витримувати обробку дезінфікуючими засобами та стерилізацію.

Рідинні потоки прийнято стерилізувати різноманітними методами, з яких практичний інтерес представляють термічний, радіаційний, фільтраційний і частково хімічний. Найбільш розповсюджений в промисловості термічний метод стерилізації рідких і твердих матеріалів заснований на відомому факті пагубної дії на живі клітини високих температур. Основний недолік термічної стерилізації, не зважаючи на її широке використання в промисловості, полягає у втратах властивостей

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		86

поживного середовища, оскільки компоненти середовища можуть виявитися нестабільними до дії високих температур. Проте при постійному контролі температури та часу стерилізації виникнення цих проблем можна мінімізувати.

Інші методи стерилізації мають значно менше поширення. Зокрема, радіаційний метод, заснований на опроміненні матеріалів дозами іонізуючого випромінювання (головним чином γ -випромінювання), дає гарні результати при стерилізації невеликих об'єктів в основному медичного призначення (перев'язувальний матеріал і т.д.). Промислове використання γ -випромінювання для стерилізації рідких та газоподібних середовищ безперечно можливе, але використовується рідко через трудність створення та експлуатації необхідних в цьому випадку потужних джерел γ -квантів; використання ж малопотужних випромінювачів робить процес малоефективним.

В окремих випадках застосовують хімічні стерилізуючі агенти, тобто речовини з явно вираженою сильно асептичною дією. Основною проблемою в цьому випадку є необхідність видалення стерилізуючого агенту з поживного середовища після гибелі сторонньої мікрофлори і до внесення інокуляту продуцента. Хімічні антисептики мають бути не тільки високоефективними, але і легко розкладатися при зміні умов після завершення стерилізації. Вибір таких речовин не великий і їх неможна вважати легко доступними; до числа найкращих з них відноситься пропіолактон, що має сильну бактерицидну дію і легко гідролізує в подальшому в абсолютно нетоксичну молочну кислоту. Хімічна стерилізація поживних середовищ не знайшла промислового використання, проте в певних випадках може використовуватись в лабораторних та дослідних умовах.

Також до поширених методів не можна віднести метод стерилізуючої фільтрації через апаратні труднощі. Метод заснований на здатності

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		87

полупрониких мембран з крупними порами (типу мікрофільтраційних мембран) пропускати рідку фазу і затримувати (концентрувати) клітини мікроорганізмів. Мікро- і ультрафільтрація принципово відрізняються від звичайної фільтрації тим, що розділяють гомогенні суміші (розчини) і дають не осад речовини, що затримується, а її концентрат, тоді як розчин, що пройшов через мембрану – пермеат – не містить домішок, затриманих мембраною. Тоді клітини мікроорганізмів (тверда фаза) ускладнюють процеси мембранного розділення, проте, враховуючи їх відносно крупні розміри в порівнянні з діаметром пор мембрани (450 мкм і менше), вони можуть бути відділені методом концентрування на достатньо крупнопористих мембранах при інтенсивному перемішуванні концентрату, що усуває осадження клітин на мембрані.

Загалом, метод стерилізуючої фільтрації є ідеальним засобом стерилізації лабільних, в тому числі термічно нестійких рідких та газових середовищ, оскільки він може бути проведений при низькій температурі і потребує лише градієнту тиску по різні сторони мембрани. Основна наявна трудність – наявність термостійких мембран, зданих переносити багатократну термічну стерилізацію їх самих в ході експлуатації [69].

Відповідно, термічний спосіб стерилізації поживного середовища найбільше відповідає техніко-економічним вимогам виробництва і має наступні переваги: легке транспортування теплоагенту, здатність проникати у важкодоступні місця, більша тепловіддача при конденсації, нетоксичність. Конденсат водяного пару не змінює складу середовища і, зволожуючи спори, сприяє збільшенню швидкості їх гибелі в 10-1000 разів [67]. Отже з метою знезараження поживного середовища використаємо метод термічної стерилізації. Цей метод оснований на тому, що при високих температурах гинуть як вегетативні клітини, так і спори мікроорганізмів. Стерилізацію проводять у реакторі при температурі 120°C протягом години.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		88

5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Технічна характеристика реактора зі змішувачем

Реактор зі змішувачем для поживного середовища

1. Номінальний об'єм, м ³	1
2. Коефіцієнт заповнення	0,7.
3. Тип перемішуючого пристрою	турбінна шестилопатева мішалка
4. Кількість мішалок	1.
5. Частота обертання вала мішалки с ⁻¹	2.
6. Температура на вході, °C:	
- у змішувач	120;
- у рубашку	20.
7. Температура суміші на виході з апарату, °C:	
- зі змішувача	30;
- з рубашки	45.
8. Потужність електродвигуна, кВт	1,1
9. Тип електродвигуна – електродвигун асинхронний AIR71B2	
10. Габаритні розміри, мм:	
- внутрішній діаметр, м	1,2;
- висота корпусу, м	1,1;
- повна висота днища, м	0,34.
11. Маса сухого апарата, кг	770.

Необхідно розрахувати змішувач для поживного середовища.
 $V_{\text{пс}}=0,5 \text{ м}^3$, ступінь заповнення $\varphi=0,7$. Температура в апараті підтримується на рівні $t_c=37^\circ\text{C}$.

Теплофізичні властивості середовища:

У стерильний апарат об'ємом 1 м^3 заливають $0,41\text{ м}^3$ водопровідної води (з врахуванням 10% утворюваного конденсату і внесення компонентів середовища, об'єм поживного середовища збільшується до $0,5\text{ м}^3$), отже,

$$V_{\text{ПС}} = 0,5 (\text{м}^3).$$

Кількість посівного матеріалу (інокуляту) (ПМ) $\sim 1\%$ від об'єму ПС:
 $V_{\text{ПМ}} = 0,005 (\text{м}^3).$

Теплофізичні властивості за визначальної температури $-t_c = 30^\circ\text{C}$.

Густина поживного середовища (ПС):

$$\rho_c = 1057 (\text{кг}/\text{м}^3).$$

Коефіцієнт динамічної в'язкості ПС:

$$\mu_c = 1,55 \cdot 10^{-3} (\text{Па} \cdot \text{с}).$$

Коефіцієнт кінематичної в'язкості розчину ПС:

$$\nu_c = \frac{\mu_c}{\rho_c},$$

(5.1)

$$\nu_c = \frac{0,00155}{1057} = 1,46 \cdot 10^{-6} (\text{м}^2/\text{с}).$$

Теплоємність розчину ПС:

$$c_c = 4185 \text{ Дж}/(\text{кг} \cdot \text{K}) = 4 (\text{кДж}/\text{кг} \cdot \text{K})$$

Коефіцієнт теплопровідності розчину ПС:

$$\lambda_c = 0,57 \text{ Вт}/(\text{м} \cdot \text{K})$$

Маса поживного середовища:

$$m_{\text{ПС}} = \rho_c \cdot V_{\text{ПС}},$$

(5.2)

$$m_{\text{ПС}} = 1057 \cdot 0,5 = 528,5 \sim 529 \text{ кг}.$$

Теплофізичні властивості сплаву:

Густина сплаву змішувача:

$$\rho_{\text{СП}} = 7850 (\text{кг}/\text{м}^3)$$

Теплоємність сплаву змішувача (при 100°C):

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		90

$$c_{\text{сп}} = 470 \text{ (Дж/кг} \cdot \text{К)} = 0,45 \text{ (кДж/кг} \cdot \text{К)}$$

Коефіцієнт теплопровідності сплаву змішувача (при 100°C):

$$\lambda_{\text{сп}} = 16,3 \text{ (Вт/м} \cdot \text{К)}.$$

Конструктивний розрахунок:

Метою конструктивного розрахунку є визначення розмірів змішувача та основних конструктивних елементів.

Номінальний об'єм апарату розраховуємо за формулою:

$$V_{\text{н}} = \frac{V_{\text{пс}}}{K_3}, \quad (5.3)$$

$$V_{\text{н}} = \frac{0,5}{0,7} = 0,714 \text{ (м}^3\text{)}$$

Оскільки немає апаратів з таким $V_{\text{н}}$ тому буде використовуватись реактор з найбільш близьким об'ємом, що відповідає об'єму ферментеру для виробничого біосинтезу, в який і буде подаватися дане середовище: $V_{\text{н}}=1 \text{ (м}^3\text{)}$

За ГОСТ 20680–86 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами вертикальные. Общие технические требования» було обрано апарат типу 0 з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою. Приймаємо внутрішній діаметр апарату [70]:

$$D_{\text{вн}} = 1200 \text{ мм} = 1,2 \text{ (м)}.$$

$$D_{\text{руб}} = 1300 \text{ мм} = 1,3 \text{ (м)} [8]$$

$$\text{Висота корпусу } H = 1100 \text{ мм} = 1,1 \text{ (м)}.$$

Розрахуємо днище апарату. Висоту еліптичної частини днища реактора визначимо за формулою [67, 71]

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot D_{\text{вн}}, \quad (5.4)$$

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot 1200 = 300 \text{ (мм)} = 0,3 \text{ (м)}.$$

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533–78 «Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		91

котлов. Основные размеры» [71] та [72] знаходимо решту конструктивних розмірів днища апарату:

$F_p = 3,4 \text{ м}^2$ – площа поверхні теплообміну рубашки;

$H_{\text{ж}} = 0,76 \text{ м}$ при $\varphi=0,75$; $0,54$ при $\varphi=0,5$ – висота рівня рідини;

$h_{\text{о.дн}} = 40 \text{ мм} = 0,04 \text{ м}$ – висота основи еліптичного днища;

$S_{\text{дн}} = 10 \text{ мм} = 0,01 \text{ м}$ – товщина стінки еліптичного днища;

$F_{\text{вн.дн}} = 1,71 \text{ м}^2$ – внутрішня поверхня еліптичного днища;

$V_{\text{дн}} = 270,4 \text{ дм}^3 = 0,2704 \text{ м}^3$ – об'єм еліптичного днища.

$m_{\text{дн}} = 137 \text{ кг}$ – маса днища

$h_{\text{дн}} = h_{\text{ел.дн}} + h_{\text{о.дн}} = 0,3 + 0,04 = 0,34 \text{ (м)}$ – повна висота днища.

(5.5)

Повний об'єм апарату:

$$V = V_{\text{ц}} + 2 \cdot V_{\text{дн}},$$

(5.6)

звідки об'єм циліндричної частини:

$$V_{\text{ц}} = V - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 1 - 2 \cdot 0,2704 = 0,4592 \text{ (м}^3\text{)}.$$

(5.7)

Висота циліндричної частини апарату:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2} = \frac{0,4592 \cdot 4}{3,14 \cdot 1,2^2} = 0,406 \text{ (м)}.$$

(5.8)

Висоту рівня рідини в апараті знаходять за формулою:

$$H_p = \frac{4 \cdot (V_p - V_{\text{дн}})}{\pi D^2} + h_{\text{дн}},$$

(5.9)

$$H_p = \frac{4 \cdot (0,7 - 0,2704)}{3,14 \cdot 1,2^2} + 0,34 = 0,72 \text{ (м)}.$$

Загальна висота апарату без приводу, без штуцерів, без опор складає:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot h_{\text{дн}} = 0,406 + 2 \cdot 0,34 = 1,086 \text{ (м)}.$$

(5.10)

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		92

Загальна маса апарату дорівнює:

$$G_{\text{ап}} = G_{\text{об.к}} + 2 \cdot G_{\text{дн.к}} + G_{\text{об.р}} + G_{\text{дн.р}} + G_{\text{н}} = 78 + 2 \cdot 137 + 118 + 80 + 220 \\ == 770 \text{ кг},$$

(5.11)

де $G_{\text{об.к}}$ – маса обечайки корпусу, кг;

$G_{\text{дн.к}}$ – маса кришки або днища, кг;

$G_{\text{об.р}}$ – маса обечайки рубашки, кг;

$G_{\text{дн.р}}$ – маса днища рубашки, кг;

$G_{\text{н}}$ – маса неврахованих вузлів та деталей (приймаємо 40% від маси перерахованих вузлів та деталей), кг.

$$G_{\text{об.к}} = \rho \cdot V_{\text{об.к}} = 7850 \cdot 0,00999 = 78 \text{ (кг)},$$

(5.12)

$$V_{\text{об.к}} = (D_{\text{руб}} + s_{\text{руб}}) \cdot \pi \cdot H_{\text{ц}} \cdot s_{\text{руб}} = (1,3 + 0,006) \cdot 3,14 \cdot 0,406 \cdot 0,006 \\ = 0,00999 \text{ (м}^3\text{)},$$

(5.13)

$$G_{\text{дн.к}} = 137 \text{ кг};$$

$$G_{\text{об.р}} = \rho \cdot V_{\text{об.р}} = 7850 \cdot 0,015 = 117,75 \text{ (кг)},$$

(5.14)

$$V_{\text{об.р}} = (D_{\text{вн}} + s) \cdot \pi \cdot H_{\text{ц}} \cdot s = (1,2 + 0,01) \cdot 3,14 \cdot 0,406 \cdot 0,01 = 0,015 \text{ (м}^3\text{)},$$

(5.15)

$$G_{\text{дн.р}} = 80 \text{ кг}.$$

Розрахунок механічного перемішуючого пристрою:

1. За методикою нормативного документу РД 26-01-90-85 Механические перемешивающие устройства. Метод расчета [73] для розрахунку перемішуючих пристроїв вертикальних ємнісних апаратів здійснюємо розрахунок шестилопатової відкритої турбінної мішалки (рис. 5.7).

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		93

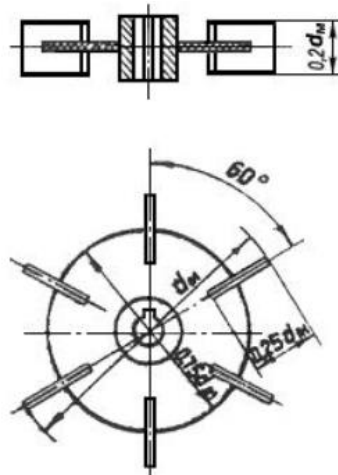


Рис.5.7 Турбінна відкрита мішалка [73]

За [72] при розрахунку турбінної мішалки мають виконуватись наступні співвідношення (рис. 5.8):

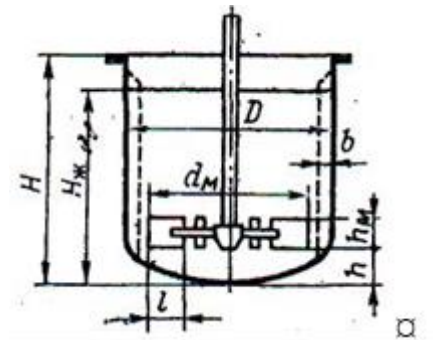


Рис. 5.8 Співвідношення розмірів турбінної мішалки

$$D/d_M=3\div 4;$$

$$h_M/d_M=0,2;$$

$$h/d_M=0,4\div 1;$$

$$b/d_M=0,1;$$

$$\xi_M=8,4 \text{ (коефіцієнт опору)}$$

Отже, діаметр перемішуючого пристрою:

$$d_M = \frac{1}{3} \cdot D = \frac{1}{3} \cdot 1,2 = 0,4 \text{ (м)},$$

(5.16)

Висота розміщення мішалки над дном апарату:

$$h = d_M \cdot 0,6 = 0,24 \text{ (м)},$$

(5.17)

За АТК 24.201.17-90 «Мешалки. Типы, параметры, конструкция, основные размеры и технические требования» [74] висота мішалки:

$$h_m = 0,09 \text{ (м)},$$

Ширина лопасті лопасті:

$$b_m = 0,08 \text{ (м)},$$

Довжина лопасті мішалки:

$$l_m = 0,2 \cdot d_m = 0,25 \cdot 0,4 = 0,1 \text{ (м)},$$

(5.18)

З рис. 5.8 та 5.9 знаходимо наступні дані:

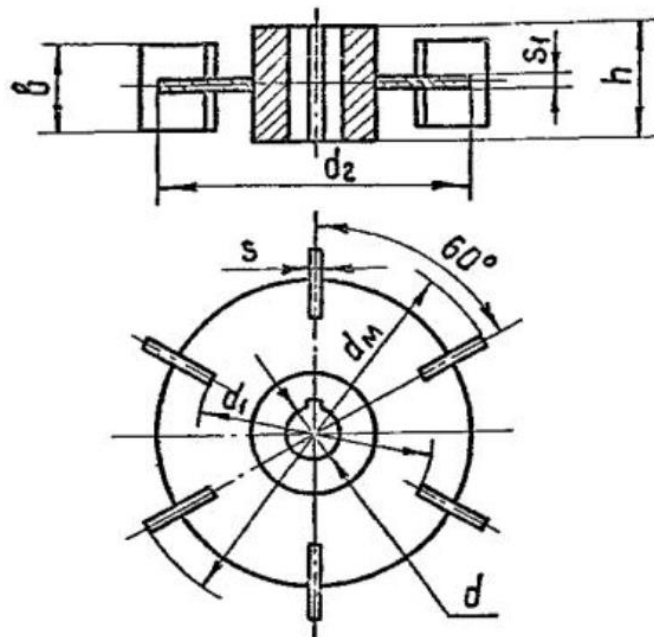


Рис. 5.9 Мішалка турбінна відкрита, тип 03

$$s_1 = h_m - b_m = 0,09 - 0,08 = 0,01 \text{ (м)}$$

(5.19)

$$d_1 = d_m - l_m = 0,4 - 0,1 = 0,3 \text{ (м)}$$

(5.20)

$$d = 0,04 \text{ (м) (за табл.)}$$

$$s = 0,006 \text{ (м) (за табл.)}$$

$$d_2 = 0,75 \cdot d_m = 0,3 \text{ (м)}$$

(5.21)

Для визначення необхідності встановлення відбиваючих перегородок розрахуємо глибину воронки:

Критерій Рейнольдса:

$$Re = \frac{\rho_p \cdot n \cdot d_M^2}{\mu_p}, \quad (5.22)$$

$$Re = \frac{1387,8 \cdot 2 \cdot 0,4^2}{0,0017} = 261233.$$

Параметр висоти завантаження апарата Г:

$$\gamma(\Gamma) = 8 \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \cdot \frac{0,72}{1,2} + 1 = 5,8. \quad (5.23)$$

Параметр гідравлічного опору мішалки Е:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_M z_M Re_{\Gamma}^{0,25}} = \frac{5,8}{8,4 \cdot 1 \cdot (261233)^{0,25}} = 0,031, \quad (5.24)$$

де ξ_M – критерій опору; z – кількість мішалок на валу.

Глибина воронки в реакторі без відбиваючих перегородок:

$$h_B = \frac{B \cdot n^2 \cdot d_M^2}{2} = \frac{2,3 \cdot 2^2 \cdot 0,4^2}{2} = 0,368 \text{ м}, \quad (5.25)$$

де B – параметр, значення якого визначається з номограми в залежності від E і типу мішалку.

Так як глибина воронки вище допустимого значення необхідне встановлення відбиваючих перегородок.

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{\Gamma p} = H_p - h = 0,72 - 0,4 = 0,32 \text{ м}. \quad (5.26)$$

Оскільки $h_B > h_{\Gamma p}$, то в реакторі необхідно встановити перегородки.

Рекомендовано встановити 4 перегородки.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		96

Ширина перегородки:

$$b = 0,1 \cdot d_M = 0,04 \text{ (м)}, \quad (5.27)$$

Діаметр вала мішалки:

$$d_B = C \cdot d_M = 0,117 \cdot 0,4 = 0,0468 \sim 0,05 \text{ (м)}, \quad (5.28)$$

де $C=0,117$ – для турбінної мішалки

Колова швидкість для турбінної мішалки: $w=(2,5 \dots 10)$ м/с, приймаємо 3 м/с.

Частота обертання [75]:

$$n = \frac{w}{\pi d_M} = \frac{3}{3,14 \cdot 0,4} = 2 \text{ (с}^{-1}\text{)}. \quad (5.29)$$

Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування:

Необхідно врахувати потужність, що витрачається в ущільненні валу мішалки та на подолання опору внутрішніх пристроїв реактора.

Потужність, що витрачається на тертя в ущільненнях вала мішалки залежить від діаметра вала d_B в місці ущільнення.

$$d_B = C \cdot d_M = 0,117 \cdot 0,4 = 0,0468 \sim 0,05 \text{ (м)}, \quad (5.30)$$

Потужність, що витрачається на тертя в одинарному торцевому ущільненні:

$$N_{\text{ущ}} = 6020 \cdot d_B^{1,3} = 6020 \cdot 0,05^{1,3} = 122,53 \text{ (Вт)}. \quad (5.31)$$

Знаходимо потужність, що витрачається на перемішування. В залежності від $Re_{\text{перем}}$ задаємось критерієм K_N – коефіцієнт потужності, для турбінної мішалки: $K_N=6$

$$N = K_N \cdot \rho_p \cdot n^3 \cdot d_M^5 = 6 \cdot 1387,8 \cdot 2^3 \cdot 0,4^5 = 682 \text{ (Вт)}. \quad (5.32)$$

Потужність електродвигуна:

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		97

$$N_1 = \frac{k_n \cdot k_n \cdot N + N_{ущ}}{\eta}, \quad (5.33)$$

де $K_n=1$ – в апараті з перегородками;

$$K_n = \sqrt{\frac{H_p}{D}} = 0,77 \text{ – коефіцієнт, що враховує рівень рідини в апараті;}$$

$\eta = 0,85 \div 0,9$ – коефіцієнт корисної дії привода.

$$N_1 = \frac{0,77 \cdot 1 \cdot 682 + 122,53}{0,85} = 762 \text{ (Вт)}. \quad (5.34)$$

Згідно даних розрахунків візьмемо з каталогу електродвигунів стандартний двигун та ротор: електродвигун асинхронний АІР71В2 на 1,1 кВт 3000 об/хв. У даному випадку він буде працювати не на повну потужність.

Тепловий розрахунок

Тепловий розрахунок полягає у тому, щоб вирахувати необхідну площу поверхні теплообміну, котру знаходять з основного рівняння теплопередачі:

$$F = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{cp}}, \quad (5.35)$$

де Q – теплове навантаження теплообмінного апарату, визначають з теплового балансу; K – коефіцієнт теплопередачі; Δt_{cp} – середній температурний натиск.

Однією із задач реактора це охолодити суміш з температури $t_1 = 120^\circ\text{C}$ до температури $t_2 = 30^\circ\text{C}$

Розрахуємо підвід теплоти для нагріву реактора:

$$Q = \sum G_i \cdot c_i \cdot (t_1 - t_2), \quad (5.36)$$

$$Q = (770 \cdot 0,45 + 529 \cdot 4) \cdot (120 - 30) = 221625 \text{ (кДж)},$$

де G_1 – маса апарата;

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		98

G_2 – маса поживного середовища;

c_1 – питома теплоємність матеріалу апарата;

c_2 – питома теплоємність поживного середовища.

Визначаємо середню температуру теплоносія. Якщо в реакторі, після автоклавування температуру необхідно зменшити з $t_1 = 120^\circ\text{C}$ до температури $t_2 = 30^\circ\text{C}$ – температура поживного середовища для культивування.

При охолодженні суміші від t_1 до t_2 холодною водою (припустимо, що температура водопроводу буде завжди $t_3 = 20^\circ\text{C}$, згідно з СанПіН) кінцева температура води в рубашці, по мірі охолодження поживного середовища, буде зростати. В кінці процесу охолодження температура води стане рівною $t_4 = 45^\circ\text{C}$. Тоді середня різниця температур складе:

$$\Delta t_{\text{cp}} = \frac{t_1 - t_2}{\ln\left(\frac{t_1 - t_3}{t_2 - t_3}\right)} \cdot \frac{A - 1}{A \cdot \ln A} = \frac{120 - 30}{\ln\left(\frac{120 - 20}{30 - 20}\right)} \cdot \frac{2 - 1}{2 \cdot \ln 2} = 28,2^\circ\text{C},$$

(5.37)

$$A = \frac{t_2 - t_3}{t_4 - t_2} = \frac{30 - 20}{45 - 30} = 2.$$

(5.38)

Тоді:

$$M_T = \frac{Q}{C_T \cdot \Delta t_T} = \frac{22,16 \cdot 10^7}{4187 \cdot 28,2} = 1877(\text{кг}),$$

(5.39)

де $C_T = 4187$ (Дж/кг · К) – питома теплоємність теплоносія,

Масові витрати теплоносія:

$$G_T = \frac{M_T}{\tau_{\text{пр}}} = \frac{1877}{3600} = 0,52 (\text{кг/с}),$$

(5.40)

Для визначення поверхні теплообміну необхідно знаходимо коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці та від середовища у ферментері та коефіцієнт теплопередачі.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		99

Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія:

$$a = \frac{D_c - 2\delta_{ст} - D}{2}, \quad (5.41)$$

де $\delta_{ст} = 0,01$ м – товщина стінки, $D_c = 1,3$ м – діаметр сорочки ферментера,

$$a = \frac{1,3 - 2 \cdot 0,01 - 1,2}{2} = 0,04 \text{ (м)}, \quad (5.42)$$

$$b = 0,15 - a = 0,15 - 0,04 = 0,11 \text{ (м)}. \quad (5.43)$$

Еквівалентний діаметр:

$$d_{екв} = \frac{2ab}{a+b} = \frac{2 \cdot 0,04 \cdot 0,11}{0,04 + 0,11} = 0,059 \text{ (м)}. \quad (5.44)$$

Середній діаметр реактора:

$$D_{ср} = D_c - a = 1,3 - 0,04 = 1,26 \text{ (м)}. \quad (5.45)$$

Критерій Нуссельта визначаємо з критеріального рівняння

$$Nu_c = 1,35 Re_c^{0,59} \cdot Pr_c^{0,38} \left(\frac{\mu_c}{\mu_{ст}} \right)^{0,14}. \quad (5.46)$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_c = \frac{d_m}{\nu_c} (n \cdot d_m) = \frac{0,4}{1,46 \cdot 10^{-6}} (2 \cdot 0,4) = 219178. \quad (5.47)$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_c = \frac{\mu_c \cdot c_c}{\lambda_c} = \frac{0,00155 \cdot 4185}{0,57} = 11,38. \quad (5.48)$$

$$Nu_c = 1,35 \cdot (219178)^{0,59} \cdot 11,38^{0,38} = 4817.$$

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		100

Коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини у реакторі становить:

$$\alpha_c = \frac{Nu_c \lambda_c}{D} = \frac{4817 \cdot 0,57}{1,2} = 2288,075 \text{ (Вт/м}^2 \cdot \text{К)}.$$

(5.49)

Визначасмо коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія.

Об'ємні витрати теплоносія:

$$V_T = \frac{G_T}{\rho_T} = \frac{0,52}{996,17} = 0,00052 \left(\frac{\text{м}}{\text{с}} \right),$$

(5.50)

де $\rho_T = 996,17$ – густина теплоносія;

Швидкість руху теплоносія:

$$w_T = \frac{V_T}{ab} = \frac{0,00053}{0,04 \cdot 0,11} = 0,118 \left(\frac{\text{м}}{\text{с}} \right).$$

(5.51)

Критерій Рейнольдса:

$$Re_T = \frac{w_T d_{\text{екв}}}{\nu_T} = \frac{0,12 \cdot 0,059}{0,838 \cdot 10^{-6}} = 8308,$$

(5.52)

де $\nu_T = 0,838 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$ – кінематична в'язкість теплоносія;

Так як $Re_T < 10000$, то критерій Нуссельта визначаємо за критеріальним рівнянням:

$$Nu_T = 0,037 Re_T^{0,8} \cdot Pr_T^{0,43}.$$

(5.53)

Критерій Прандтля:

$$Pr_T = \frac{\mu_T \cdot c_T}{\lambda_T} = \frac{0,835 \cdot 10^{-3} \cdot 4190}{0,599} = 5,6,$$

(5.54)

де $\mu_T = 0,835 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$ – коефіцієнт динамічної в'язкості теплоносія;

$C_T = 4190 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – питома теплоємність теплоносія при $t_T = 20^\circ\text{C}$,

$\lambda_T = 0,599 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$ – питома теплопровідність теплоносія при $t_T = 20^\circ\text{C}$.

Тоді:

$$Nu_T = 0,037 \cdot (8308)^{0,8} \cdot 5,6^{0,43} = 106.$$

Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці становить:

$$\alpha_T = \frac{Nu_T \lambda_T}{d_{\text{екв}}} = \frac{106 \cdot 0,599}{0,059} = 1076 \left(\frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}} \right). \quad (5.55)$$

Коефіцієнт теплопередачі становить:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{1}{\alpha_T}} = \frac{1}{\frac{1}{2288,075} + \frac{0,01}{16} + \frac{1}{1076}} = 502 \left(\frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}} \right), \quad (5.56)$$

де $\lambda_{\text{ст}} = 16 \text{ Вт/м} \cdot \text{К}$ – теплопровідність стінки.

Розрахункова поверхня теплообміну:

$$F_p = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{\text{ср}} \cdot \tau_{\text{пр}}} = \frac{22,16 \cdot 10^7}{502 \cdot 28,2 \cdot 3600 \cdot 2,5} = 2 \text{ (м}^2\text{)}. \quad (5.57)$$

Дійсна поверхня теплообміну:

$$F_{\text{дій}} = \pi \cdot D_{\text{вн}} \cdot H_c + F_{\text{вн,дн}} \quad (5.58)$$

$$H_c = H_p - h_{\text{дн}} \quad (5.59)$$

$$H_c = 0,72 - 0,34 = 0,38 \text{ (м)}.$$

Тоді:

$$F_d = 0,38 \cdot 3,14 \cdot 1,2 + 1,71 = 3,142 \text{ (м}^2\text{)}.$$

Умова теплообміну виконується, оскільки:

$$\begin{aligned} F_p &< F_d \\ 2 \text{ м}^2 &< 3 \text{ м}^2 \end{aligned}$$

Можна зробити висновок, що поверхня теплообміну сорочки апарата забезпечить заданий температурний режим протягом його роботи.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		102

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Дозатор:

Для подачі компонентів поживного середовища у реактор застосовують об'ємно-ваговий дозатор, який об'єднує в собі переваги вагового і об'ємного дозаторів. Завдяки цьому дозатору досягнута швидкість дозування об'ємного дозатора з точністю вагового.

Вибір насосів:

Насоси можна розділити на два основні класи: динамічні та об'ємні. До динамічних відносяться насоси, в яких відбувається перетворення енергії під впливом динамічної взаємодії між потоком рідини і робочими частинами. До об'ємних відносять насоси в яких переміщення рідини відбувається в результаті періодичної зміни об'єму камери при зворотно-поступальному чи обертальному руху робочого органу.

В біотехнологічній промисловості широко використовуються центробіжні насоси. Їх перевагами є можливість безпосереднього з'єднання зі швидкохідним двигуном, паровою чи газовою турбіною, рівномірність потоку, малі габарити, маса і вартість [67].

Робочим органом в відцентрових насосах є насаджене на вал колесо, що має лопаті, розміщені між дисками, і розташоване всередині спіралеподібного корпусу.

Рідке середовище, яке потрапляє у внутрішню робочу камеру, захоплюється лопатками робочого колеса і починає переміщатися разом з ними. За рахунок обертання колеса створюється відцентрова сила, яка впливає на масу середовища, що перекачується, яке знаходиться всередині колеса, і передає йому частину кінетичної енергії, яка потім переходить в потенційну енергію напору. Під впливом відцентрової сили рідке середовище відкидається до стінок робочої камери, де створюється надлишковий тиск. Перебуваючи під надлишковим тиском, рідке середовище виштовхується через напірний патрубок.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		103

У той момент, коли рідке середовище з центральної частини робочої камери відкидається до стінок, створюється розрідження повітря, що і забезпечує всмоктування нової порції рідини через вхідний патрубок, що забезпечує безперервну подачу середовища, що перекачується. При підготовці поживного середовища доцільно використовувати герметичні центробіжні насоси типу ЦГ, що унеможливають контамінацію поживного середовища і його викиди у навколишнє середовище. До того ж, герметичні центробіжні насоси мають максимальний ККД порівняно з іншими центробіжними насосами і, як наслідок, найменші показники затрати електроенергії. Такі насоси можуть перекачувати рідини з температурою від -40°C до +360°C. Продуктивність – від 3 до 200 м³/год. Потужність - від 1,1 до 75 кВт [76, 77].

Для підготовки очищеної води можна встановлювати водоочисні системи, наприклад системи водопідготовки PURELAB Option-R60, що виробляє воду високого ступеню очистки типу II. Продуктивність такої системи досягає 60 л/год. Система очищення включає в себе фільтр попереднього очищення води, модуль зворотного осмосу, деіонізаційний картридж і УФ лампу. Очищена вода рециркулює в системі, за рахунок чого підтримується висока якість води.

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Кількість технологічних та вентиляційних викидів в атмосферу на даному підприємстві є незначним і не забруднює навколишнє середовище.

Основними методами запобігання забруднення атмосфери є герметизація виробничих апаратів і застосування різних типів одиночних чи батарейних циклонів, скрубєрів і т.д. Для зниження запиленості промислових викидів в атмосферу білковими й іншими продуктами мікробного синтезу після їх сушки, пакування і заправки в транспорт використовують скрубєр

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		104

Вентурі. Також підвищення чистоти викидів досягають переходом до глибинного способу культивування мікроорганізмів [67, 78].

В нашому випадку очистка повітря від механічних домішок здійснюється в циклонах. Очищене повітря йде в атмосферу, а твердий осад – змішується зі стоками і подається на біологічну очистку.

Схема очистки стічних вод включає первинну і вторинну очистку. Первинна включає механічне відділення забруднень (вловлювання крупних домішок). Для видалення крупного сміття, каменів, частинок піску застосовують решітки, сита, пісковловлювачі та гідроциклони; відділення дрібних частинок здійснюють у відстійниках; для більш ретельної очистки стічні води пропускають через пісочні і сітчасті фільтри. Вторинна очистка включає очистку стічних вод в системі очисних споруд, наприклад використовуючи біологічну очистку стічних вод Biotal.

Охорона праці:

1. Персонал допускається до роботи лише у спец. одязі, спецвзутті та з індивідуальними засобами захисту, що регламентовані у виробничій інструкції;

2. Усе обладнання, з електроприводом та силове електро обладнання мусить мати заземлення чи занулення;

3. На робочих місцях наявні аптечки першої допомоги;

4. Технологічний процес проводиться тільки за повної справності та працездатності виробничого обладнання та КВП;

5. Для зменшення шуму на технічному поверсі встановлено вентеляційне обладнання зі звукозахисною ізоляцією. Враховані технічні рішення, що забезпечують безпечну експлуатацію вентиляційних систем: зворотні та вогнезатримуючі клапани на повітроводах згідно з призначенням; централізоване відключення вентиляційних установок при пожежі.

Пожежна безпека приміщень має бути забезпечена такими проектними та інженерно технічними рішеннями задля унеможливлення виникнення пожежі чи вибуху та забезпечення пожежної безпеки [79]:

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		105

1. Приміщення що мають різну пожежну безпеку мусять бути розділені протипожежними перегородками з гіпсокартону що заповненні мінеральними плитами (з границею вогнестійкості 1.25 години), та з протипожежними дверима (з границею вогнестійкості 0,6 години);

2. У коридорах на шляхах евакуації для персоналу передбачено протидимові та протипожежні перегородки;

3. На шляхах евакуації персоналу у нішах розмішені пожежні шафи з пожежними кранами;

4. Електропроводка за підвісною стелею має бути виконана з кабелів з мідними жилами у оболонці, для запобігання розповсюдження горіння;

5. Проводка кабелів та дротів крізь стіни виконана з обрізів сталевих труб що закрита вогнетривкою сумішшю.

Існуючи довжина евакуаційних шляхів та ширина дверей відповідає СНиП 2.01.02-85 «Протипожежні норми» [80].

					ДП 6204. 00.000 ПЗ	Арк.
						106
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

1. У проєкті для виробництва харчового вітаміну В₂ на глюкозо-фруктозному сиропі обрано суперпродуцент *Eremothecium ashbyi* F-340 із біосинтетичною активністю 3 г/л культуральної рідини.

2. Запропоновано схему отримання продуценту шляхом здійснення підтримуючої селекції з наступним відбором колоній, які мають інтенсивне яскраво-жовте забарвлення та інтенсивно забарвлюють поживне середовище. Також у разі зниження продуцентом рівня біосинтетичної здатності запропоновано застосовувати ультрафіолетове опромінення міцелію гриба, що підвищує синтез рибофлавіну на 70–80 %.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *Eremothecium ashbyi* F-340, обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі глюкозо-фруктозного сиропу, в якості джерел нітрогену запропоновано одночасне використання дріжджового екстракту та пептону, що містять велику кількість вітамінів та факторів росту, необхідних для підвищення синтезу рибофлавіну. В якості джерел фосфору запропоновано додавання фосфатів у вигляді K₂HPO₄ у концентрації 3 г/л. Крім того, визначені раціональні параметри культивування: температура 28-30°C, тривалість 120- 125 годин, перемішування 180 об/хв., режим аерації 1,5-2 м³/м³·хв.

4. Для приготування поживного середовища для даного продуценту обрана і розрахована конструкція реактору об'ємом 1 м³ з механічним перемішуючим пристроєм – турбінною шестилопатевою мішалкою.

5. Розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва харчового вітаміну В₂ на глюкозо-фруктозному сиропі для харчової промисловості у флаконах по 100 г.

					ДП 6204. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ		
Розробив	Гнатюк М.О.						
Консульт.							
Керівник	Поліщук В.Ю.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	107	116
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

